Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICA

DETERMINARI IMUNOLOGICE CALITATIVE

COD: PSL – I3- 01

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager General
Prof. Dr. Carmen Dorobăţ

VERIFICAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

Elaborat:
Responsabil analiza
Dr. Cristina Mirela Petrovici

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
RC	0.	01.05.2013	As.Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.	01.05.2013	Dr. Rodica Fântânaru					
Sef Compartiment	2.	01.05.2013	Dr. Cristina Mirela Petrovici					
Responsabil analiza	3.	01.05.2013	Dr. Cristina Mirela Petrovici					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

0. CUPRINS

CAPITOLUL

1. Scop si domeniul de aplicare

2. Documente de referinta si conexe

3. Definitii si abrevieri

4. Descrierea activitatii

4.1. Condiţii prealabile

4.2. Resurse necesare

4.2.1. Reactivi si materiale furnizate de truse(kituri)

4.2.2 Martori: Pozitiv/Negativ

4.2.3 Alte materiale

4.2.4. Echipamente/dispozitive

4.2.5. Condiţiile de pastrare a reactivilor din truse

4.2.6 Etape preliminare

5. Modul de lucru

5.1 Determinarea H. Pylori

5.2 Detectarea AgHBs

5.3 Detectarea Ac aHCV

5.4 Detectarea anticorpilor anti Leptospira

5.5 Detectarea markerilor imunologici in Mononucleoza infectioasa

5.6 Testul ASLO

5.7 Testul CRP

5.8 Testul FR

5.9 Testul RPR

6. Control de calitate

7. Responsabilitati

8. Inregistrari

1. SCOP SI DOMENIU DE APLICARE

Scopul acestei proceduri este de a prezenta modul de organizare si desfasurare a activitatii de incercare, pentru determinarea in vitro markerilor imunologici pentru:

- H. Pylori, Lepospira, Mononucleoza infectioasa, HB, HC, precum si a FR, ASLO, CRP, si RPR in conformitate cu cerintele impuse de metodele de laborator in vigoare.

Se aplica in compartimentul Imunologie I3, al Laboratorului.

2. DOCUMENTE DE REFERINTA

2.1 DOCUMENTE DE REFERINTA

- MCL- 01
- Metode de laborator –Editura medicala 1977

2.2. DOCUMENTE CONEXE

- Prospectele aferente fiecarui kit de reactivi

3. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI

LEPTOSPIRA - gen de spirochete subţiri, fine cu spire strânse şi regulate si capetele încârligate, mobile avand o mişcare caracteristică de înşurubare şi flexie; pătrund în organism prin tegumente şi mucoase intacte; poseda antigene de suprafaţă care confera specificitate de grup şi tip; sunt imunogene organismul uman sintetizează anticorpi faţă de antigenele de suprafaţă. Bola cauzata de ele se numeste leptospiroza.

H. PYLORI – *Helicobacter pylori* este o bacterie Gram-negativă, spiralată, flagelată, care se localizează în criptele mucoasei gastrice. Denumirea ei provine de la forma de helix, formă care se pare că este responsabilă de adaptabilitatea si capacitatea de infectare în mediul puternic acid de la nivelul stomacului. Infecţia cu Helicobacter pylori este o cauză majoră de gastrită cronică şi boala ulceroasă; de asemenea studiile epidemiologice efectuate în ultimii ani au confirmat asocierea infecţiei persistente cu un risc crescut de apariţie a cancerului gastric. În plus, această bacterie este responsabilă pentru majoritatea cazurilor de limfoame (forme de neoplazii hematologice, caracterizate prin proliferarea celulelor din ţesutul limfoid asociat mucoasei digestive.

MONONUCLEOZA INFECTIOASA – numita si "boala sarutului", este cauzata de virusul Epstein-Barr (EBV) este un virus herpetic limfotrop cu răspândire ubicuitară, care infectează aproximativ 95% din populaţie, până la vârsta adultă. O infectie EBV primara este definita serologic prin aparitia precoce a anticorpilor VCA IgM (imediat dupa debutul clinic) care ating un nivel maxim la 2 saptamani, urmata de scaderea progresiva a acestora pana la niveluri nedetectabile. Aproape simultan se produce o crestere a

anticorpilor VCA IgG. Majoritatea pacientilor cu mononucleoza infectioasa prezinta la prima testare niveluri crescute de anticorpi VCA IgG si IgM. In timp ce VCA IgM dispar in 2-3 luni de la debutul bolii, VCA IgG persista indefinit la persoanele sanatoase. Mai exista o categorie de anticorpi IgG indreptati impotriva antigenului nuclear EBV (EBNA) care apar in circulatie dupa cateva saptamani sau luni de la debutul bolii si persista timp indelungat sau chiar toata viata. La pacientii cu infectie asimptomatica detectarea EBNA IgG impreuna cu anticorpii VCA IgG si IgM este utila in diferentierea stadiului precoce de convalescenta de faza acuta a mononucleozei infectioase.

AgHBs –Antigen de suprafata al virusului hepatitei B (AgHBs) este un component al invelisului extern al virionului B. Persoanele infectate prezinta in sange pe langa particulele virale infectante si alte particule mai mici, neinfectioase care contin de asemenea AgHBs. Determinantul antigenic impotriva caruia se declanseaza raspunsul imun este comun tuturor particulelor de AgHBs.
Detectarea AgHBs in ser indica prezenta infectiei cu virusul hepatitei B. AgHBs este primul marker imunologic al infectiei, fiind prezent in ser cu cateva saptamani inainte de debutul clinic al bolii (al icterului). AgHBs ramane detectabil o perioada de 1-4 luni in cursul unei infectii acute, dupa care se negativeaza. Daca AgHBs persista mai mult de 6 luni, se considera ca infectia s-a cronicizat. Aproximativ 5-10% din adulti si 90% din nou-nascuti nu pot elimina virusul dupa infectie si devin purtatori cronici de AgHBs. O treime din pacientii purtatori de AgHBs dezvolta hepatita cronica care in timp poate evolua spre ciroza hepatica si, in unele cazuri, spre carcinom hepatocelular.

AcāHCV – Antigenul central al VHB, Ag HBc, care nu se gaseste in sange ci numai in celulele hepatice infectate determina aparitia anticorpilor anti-HBc,care apar in sange destul de timpuriu, inaintea anti-HBs, avand valoare diagnostic.
Anticorpii anti-HBc devin aproape intotdeauna detectabili in perioada de incubatie a bolii. Dupa disparitia antigenului HBs si inainte de aparitia anticorpilor anti-HBs (" fereastra imunologica "), anticorpii anti-HBc si anticorpii anti-HBc-IgM , pot fi singurii indicatori ai prezentei hepatitei B acute.
Datorita persistentei anticorpilor anti-HBc (de obicei o perioada lunga dupa infectare), detectarea acestor anticorpi este utila in scop epidemiologic, pentru a constata prevalenta infectiei cu VHB in anumite grupe de populatie.
Titrul anticorpilor anti-HBc determinat la purtatorii sanatosi de antigen HBs este in medie de 10 ori mai mare fata de cel depistat la pacientii cu hepatita acuta B, in timp ce la pacientii cu hepatita cronica B este in medie de 100 de ori mai mare. Un titru foarte ridicat de anticorpi anti-HBc chiar si la persoanele cu Ag HBs negativ, sugereaza prezenta hepatitei cronice B (infectie cu VHB criptica).

ASLO – anticorpi antistreptolizina O. Este un tip de anticorpi care neutralizeaza streptolizina (toxina streptococica); antistreptolizina O apare in sange dupa afectiuni streptococice. La pacientii infectati, streptolizina O actioneaza ca un antigen fata de care organismul dezvolta un raspuns umoral specific (antistreptolizina O sau ASLO). Nivelurile

anticorpilor devin detectabile in 1-2 saptamani de la infectia streptococica si ating un maximum dupa 3-6 saptamani; daca nivelurile ridicate persista dupa 6 saptamani sau chiar se inregistreaza o crestere a acestora se va suspecta o reinfectie. Pozitivitatea testului, confirma expunerea la streptolizina streptococica, fiind utila pentru diagnosticul
Infectiilor streptococice: angina streptococica, reumatismul articular acut, glomerulonefrita, endocardita, scarlatina si in monitorizarea regulata a pacientilor cu reumatism articular acut (la interval de 2-4 saptamani).

CRP – proteina C reactiva.Este un reactant de faza acuta care creste rapid, dar nespecific, ca raspuns la leziuni tisulare si inflamatie, fiind un indicator mai sensibil si mai prompt decat VSH. El se leaga de reziduurile de fosforil-colina ale multor fosfolipide si in special ale polizaharidului C pneumococic (de unde ii provine si numele), de cromatina si histone, avand rol in clearance-ul detritusurilor celulare, este un factor major de opsonizare, se leaga de fagocite si accelereaza fagocitarea antigenelor si microorganismelor; de fractiunea C1q a complementului, determinand activarea complementului pe calea clasica, de lipoproteinele LDL si detine probabil un rol in indepartarea acestora de la nivelul placii aterosclerotice.
CRP este un declansator proinflamator in sine deoarece stimuleaza productia monocitara de Interleukina-1, Interleukina-6 si TNF-α (factor de necroza tumoral). Desi principala sursa de CRP este ficatul, date recente indica faptul ca tesutul arterial poate produce atat CRP cat si proteine apartinand sistemului complementului. Nivelul CRP poate inregistra cresteri foarte mari (de 100 ori sau chiar mai mult) dupa traumatisme severe, infectii bacteriene, inflamatii, interventii chirurgicale sau proliferari neoplazice.

FR - Factorii reumatoizi sunt un grup heterogen de autoanticorpi fata de determinantii antigenici ai regiunii Fc a moleculelor de IgG, care formeaza complexe IgG-anti-IgG in circulatie sau in lichidul sinovial. De obicei sunt anticorpi de tip IgM, dar pot fi si de tip IgG sau IgA. Nivelul seric al factorului reumatoid este crescut in peste 70% din cazurile de poliartrita reumatoida, avand un rol important in producerea manifestarilor extraarticulare. Factorul reumatoid precede debutul bolii uneori cu mai multi ani. In prezenta sa, riscul de aparitie a artritei reumatoide este de 5-40 de ori mai mare decat la persoanele seronegative.Nu este implicat in initierea procesului inflamator care cauzeaza artrita reumatoida, dar probabil determina perpetuarea si amplificarea acestuia.In functie de prezenta sau absenta factorului reumatoid, poliartrita reumatoida este clasificata in 2 categorii: seropozitiva sau seronegativa. Pacientii seropozitivi au un risc mai mare decat cei seronegativi de a dezvolta artrita eroziva cu impotenta functionala articulara si manifestari extraarticulare cum ar fi: noduli reumatoizi, determinare pulmonara de boala, vasculita, sindrom Felty (neutropenie si splenomegalie asociate cu artrita reumatoida), polineuropatie, serozite si sindrom Sjögren secundar.
Factorul reumatoid nu este specific pentru poliartrita reumatoida, fiind intalnit si in alte boli ale tesutului conjunctiv, precum si in infectii cronice (endocardita, tuberculoza, hepatita B). Unii factori reumatoizi se pot comporta ca proteine care precipita la frig (crioglobuline) Testul este util in diagnosticul diferential si prognosticul afectiunilor inflamatorii articulare

(artrite),test screening util in cazul in care se suspecteaza crioglobulinemie mixta tip II sau sindrom Sjögren; monitorizarea seriala a pacientilor cu sindrom Sjögren (disparitia factorului reumatoid poate fi un semnal pentru debutul unui limfom).

RPR - (reagin plasma response) este un test netreponemic (nespecific) de floculare, macroscopic, folosit pentru depistarea serologica calitativa si semicantitativa a sifilisului.Totuşi, organismul nu produce întotdeauna anticorpi ca răspuns la activitatea acestei bacterii aşa că testul nu este întotdeauna exact. Testul este cel mai concludent în fazele secundare şi latente, când, cel mai probabil, este pozitiv. În timpul fazei primare şi terţiare acest test poate, în mod eronat, să dea rezultat negativ, fiind necesare alte teste înainte de excluderea diagnosticului de sifilis. O valoare pozitivă a testului indică prezenţa sifilisului. Rezultatul pozitiv trebuie confirmat prin teste treponemice de exempluTPHA – Treponema pallidum Haemagglutination Assay – (hemaglutinare pasiva – detecteaza anticorpi totali IgG si IgM).

4. DESCRIEREA ACTIVITATII

4.1. Condiţii prealabile

Temperatura camerei de lucru trebuie sa fie +23+29^{0}C. Procedura nu se executa pana cand temperatura nu se incadreaza intre aceste limite, deoarece rezultatele testelor pot fi influentate.

Fiecare nou lot de truse trebuie evaluat comparativ cu lotul anterior, antigenul testandu-se cu martorii de ser din trusa si cu alte seruri de control de reactivitate cunoscuta. Daca se obtin rezultate discrepante (diferente mai mari de o dilutie in testul cantitativ paralel), lotul nou se respinge.

Aparatele si dispozitivele necesare executarii procedurii trebuie sa fie in stare de buna functionare.

Probele de testat trebuie sa corespunda din punct de vedere cantitativ (min. 0.5ml) si calitativ. Nu se testeaza probe hemolizate, lipemice, contaminate bacterian/fungic, probe de plasma pastrate mai mult de 48h, probe de ser pastrate mai mult de 5 zile la+ 2+8^0 C. Nu se testeaza probe de LCR.

Personalul desemnat sa execute testarile trebuie sa aiba calificarea/experienta necesara.

4.2. Resurse necesare

4.2.1. Reactivi si materiale furnizate de truse(kituri)

4.2.2 Martori: Pozitiv si Negativ, livrat cu kiturile (ASLO, RPR, FR,CRP)

4.2.3 Alte materiale:

- Solutie salina fiziologica (0.9% NaCl) pentru tehnica semicantitativa
- Vas cu dezinfectant (sol. hipoclorit de sodiu 0.5-1%)

- Hartie de filtru
- Manusi latex

4.2.4. Echipamente/dispozitive

- Agitator rotativ mecanic in plan orizontal ,cu 20mm diametru de rotatie, reglat la 100 rpm
- Ceas de semnalizare (timer)
- Termometru de camera
- Pipete semiautomate intre 5 si 200 µl, conuri de prelevare galbene
- Centrifuga de masa pentru centrifugarea probelor

4.2.5. Condiţiile de pastrare a reactivilor din truse

Reactivii din trusa raman stabili pana la data expirarii (marcata pe ambalaj si etichete), daca se pastreaza corespunzator (+ 2+8^{0}C). NU se ingheata.

4.2.6 Etape preliminare

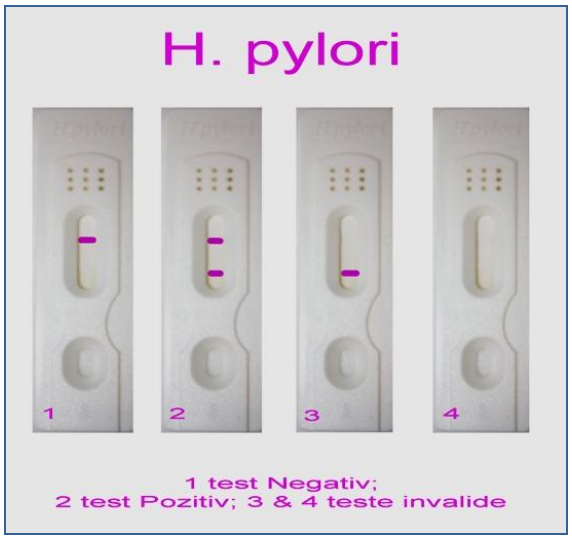
Se verifica temperatura camerei de lucru (+23+29^{0}C) .
Se pregateste spatiul de lucru pentru executarea procedurii si asigurarea masurilor de biosecuritate:
- se elibereaza locul de obiectele care nu sunt necesare,
- se aduc stative potrivite, hartie de filtru, vasul cu dezinfectant ,pentru conuri de prelevare folosite

Se scot reactivii si probele din frigider si se lasa in repaos la temperatura de lucru 30min.
Se verifica starea de functionare a echipamentelor utilizate pentru efectuarea testului si anume:
- numarul de rotatii/min ale agitatorului rotativ care trebuie sa fie 100 rpm (se numara rotatiile 15 sec x 4)
- centrifuga de masa, functional

5. MODUL DE LUCRU

5.1 Detectarea anticorpilor anti- H. Pylori
Metoda imunocromatografica
Este un test rapid, destinat determinarii calitative a anticorpilor anti-Helicobacter Pylori tip IgG. Pentru producerea lui au fost utilizate antigene recombinante purificate cu inalta specificitate. Este test rapid (max. 20 min.) destinat uzului profesional. Casetele sunt de unica utilizare.
In caseta de lucru se pun 40 µl ser de cercetat, apoi 3-4 picaturi diluant. Interpretarea rezultatului se face in decurs de 1-5 minute astfel:

- rezultat negativ – este dat de prezenta unei singure linii roz in zona de control a ferestrei de citire
- rezultat pozitiv – este dat de prezenta a doua linii roz in fereastra de citire
- rezultat invalid – in absenta oricarei linii. Se impune repetarea testului



Valoare de referinta: Negativ

5.2 Detectarea AgHBs
Metoda imunocromatografica

Este un test rapid destinat determinarii calitative a antigenului HBs. Anticorpii monoclonali sunt imobilizati in aria de testare “T”, iar anticorpii IgG antisoarece, sunt imobilizati in aria de control “C”.Anticorpii monoclonali HBs prin conjugare cu particule coloidale de aur dau un compus colorat in nuante de roz/rosu. In caseta de lucru se introduc 3 picaturi (100µl) ser de cercetat, fara a patrunde bule de aer; interpretarea testului se face in 5-15 minute; nu se interpreteaza dupa 20 minute.

- rezultat negativ – este dat de prezenta unei singure linii roz in zona de control a ferestrei de citire
- rezultat pozitiv – este dat de prezenta a doua linii roz in fereastra de citire
- rezultat invalid – in absenta oricarei linii. Se impune repetarea testului.

Teste invalide Test negativ Test pozitiv

Valoare de referinta: Negativ

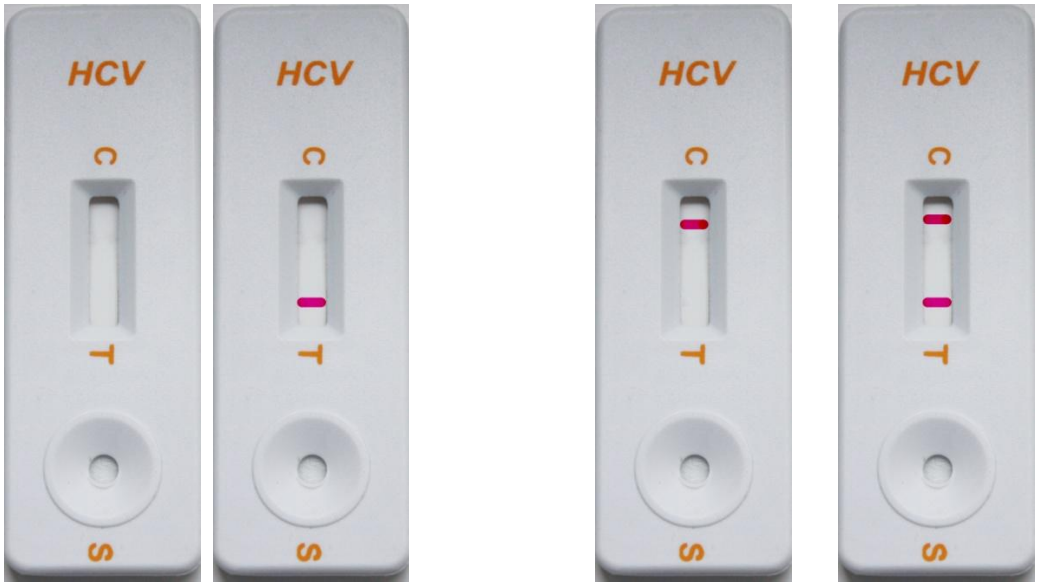
.

5.3 Determinarea Ac āHCV

Metoda imunocromatografica

Este un test rapid destinat detectarii anticorpilor IgG din ser/plasma.Anticorpii IgG prezenti in proba biologica, leaga Proteina A conjugata cu aur coloidal, formeaza un complex IgG-Proteina A-aur coloidal, care migreaza prin capilaritate de-a lungul benzii fiind capturat de antigenii specifici predepusi in zona liniei T si vor forma o linie visinie de intensitate variabila, indicand un rezultat pozitiv al testului.In zona liniei C, membrana nitrocelulozica este acoperita cu IgG de capra anti iepure iar imunocomplexul de conjugat anti iepure IgG iepure-aur coloidal, va da o linie de culoare visinie , care este linia de control ce trebuie sa apara obligatoriu ca testul sa fie valid. In caseta de lucru se introduc 5 µl de ser si 2 picaturi solutie buffer, astfel incat sa un patrunda bule de aer. Rezultatul se citeste in 15 minute in functie de concentratia de anticorpi ; linia colorata din aria de testare poate apare in 2 minute, in cazul in care exista dubii la 15 minute, se poate prelungii citirea pana la 30 minute, nu mai mult de atat.

- rezultat negativ – este dat de prezenta unei singure linii roz in zona de control a ferestrei de citire
- rezultat pozitiv – este dat de prezenta a doua linii roz in fereastra de citire
- rezultat invalid – in absenta oricarei linii. Se impune repetarea testului



Teste invalide Test negativ Test pozitiv

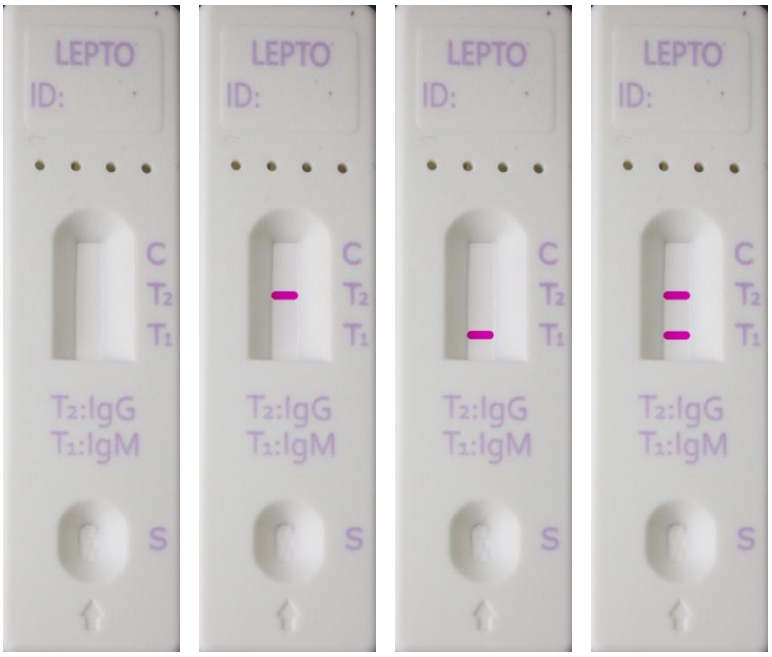
Valoare de referinta: Negativ

5.4 Detectarea anticorpilor anti Leptospira
Metoda imunocromatografica

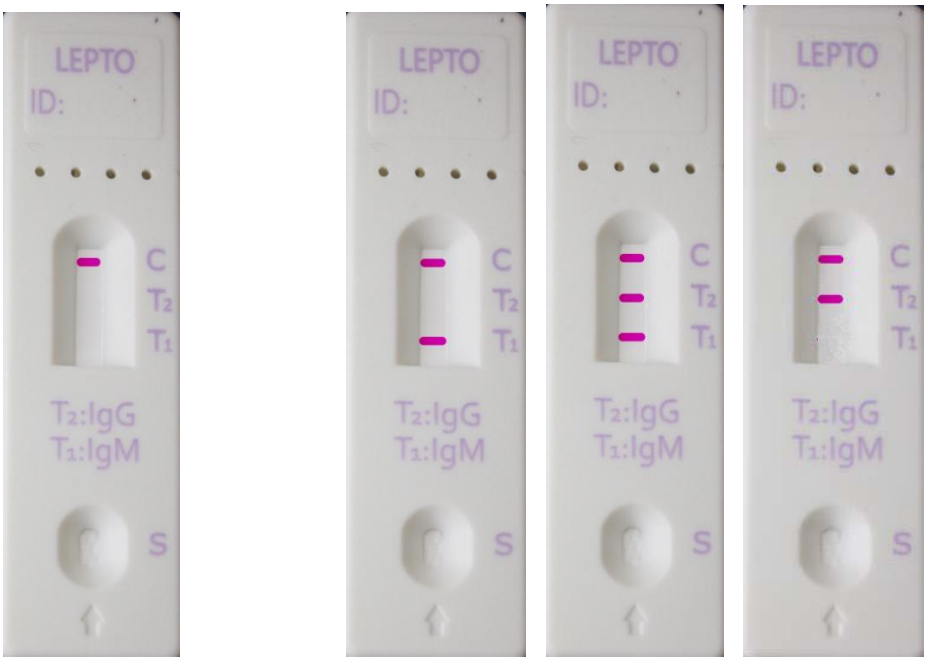
Este un test rapid care detecteaza si diferentiaza simultan anticorpii IgM si IgG la Leptospira interrogans, din ser sau plasma. Testul contine 2 benzi T1 si T2 precum si o banda de control C. Banda T1 contine reactivi ce pun in evidenta anticorpi IgM anti Leptospira interrogans, banda T2 contine reactivi care pun in evidenta anticorpi IgG anti Leptospira interrogans, iar banda C contine IgG de capra anti iepure.In caseta de lucru se introduc 2-3 (60-90 µl) picaturi ser de cercetat si o picatura ser fiziologic sau solutie tampon. Rezultatul se citeste in 10 minute dar nu peste acest interval de timp. Pozitivarea se petrece in mai putin de 2 minute.

- rezultat negativ – este dat de prezenta unei singure linii roz in zona de control a ferestrei de citire
- rezultat pozitiv – este dat de prezenta a doua linii roz in fereastra de citire (linie de control si o linie in dreptul zonei T1 sau T2)

- rezultat invalid – in absenta oricarei linii. Se impune repetarea testului



Teste invalide



Test Negativ

Teste Pozitive

Valoare de referinta: Negativ

5.5 Detectarea markerilor imunologici in Mononucleoza infectioasa
Metoda imunocromatografica – VIRAPID MONO M &G

Este un test imunocromatografic ce permite detectarea a 4 markeri imunologici ai virusului Epstein –Barr, din ser sau plasma. In afara de anticorpii heterofili Paul-Bunnell (PBHA) prezenti in 80-85% din cazuri la tineri si adulti si in mai putin de 35% din cazuri la copii mai mici de 4 ani, testul detecteaza si anticorpii IgM si IgG anti antigen capsidar viral (VCA) cat si anticorpii IgG anti antigen nuclear (EBNA), stabilindu-se astfel si stadiul bolii. Anticorpii heterofili fiind absenti intr-un numar mare de cazuri, confirmarea diagnosticului se face pe baza depistarii anticorpilor fata de proteinele specifice EBV: antigenul capsidei virale (VCA), prezenta anticorpilor VCA IgM este esentiala pentru diagnosticul infectiei acute.

O infectie EBV primara este definita serologic prin aparitia precoce a anticorpilor VCA IgM (imediat dupa debutul clinic) care ating un nivel maxim la 2 saptamani, urmata de scaderea progresiva a acestora pana la niveluri nedetectabile. Aproape simultan se produce o crestere a anticorpilor VCA IgG. Majoritatea pacientilor cu mononucleoza infectioasa prezinta la prima testare niveluri crescute de anticorpi VCA IgG si IgM. In timp ce VCA IgM dispar in 2-3 luni de la debutul bolii, VCA IgG persista indefinit la persoanele sanatoase.

Mai exista o categorie de anticorpi IgG indreptati impotriva antigenului nuclear EBV (EBNA) care apar in circulatie dupa cateva saptamani sau luni de la debutul bolii si persista timp indelungat sau chiar toata viata. La pacientii cu infectie asimptomatica detectarea EBNA IgG impreuna cu anticorpii VCA IgG si IgM este utila in diferentierea stadiului precoce de convalescenta de faza acuta a mononucleozei infectioase.
Testul folodeste o caseta dubla una pentru testul M (Mono M) si una pentru testul G (Mono G) ; se introduc cate 40 µl ser de cercetat incepand cu testul M , lasand ca fiecare picatura sa fie absorbita, apoi imediat , cate 2 picaturi de reactiv (developer solution), tinand flaconul in pozitie verticala. Interpretarea respectiv citirea testului se face in maxim 30 minute, prin compararea intensitatii culorilor liniilor aparute cu un standard de nuante (de la „0" = S negativ la „0,5" = S pozitiv nivel scazut , „1,2"= S pozitiv nivel mediu, si „3" = S pozitiv nivel crescut) livrat de producator. Liniile de control din zona C a ambelor teste trebuie sa apara ca testele sa fie valide.
Interpretarea rezultatelor

Prezenta anticorpilor VCA IgM indica infectie primara recenta cu EBV. Prezenta anticorpilor VCA IgG indica o infectie in antecedente, fara a se putea preciza vechimea acesteia. Anticorpii anti-EBNA se dezvolta la 6-8 saptamani de la infectia primara si persista toata viata. Peste 90% din populatia adulta normala prezinta anticorpi anti-VCA IgG si anti-EBNA IgG.

VCA IgG	VCA-IgM	EBNA IgG	Interpretare
-	-	-	Absenta expunerii
+	+	-	Infectie recenta
+	-	+	Infectie in antecedente
+	-	-	Infectie recenta*
+	+	+	Infectie in antecente

*Nu poate fi precizat cu certitudine momentul infectiei (recenta sau veche) deoarece 5-10% dintre pacienti nu dezvolta deloc anticorpi anti-EBNA

Limite si interferente

Anticorpii VCA IgM pot fi depistati uneori in titru mic in absenta unei infectii recente confirmate (de exemplu, infectie EBV cronica-activa)[3].

Momentul aparitiei anticorpilor anti-VCA si EBNA sufera mari variatii individuale.

Performanta testului nu este stabilita pentru pacientii imunodeprimati, nou-nascuti sau probele de sange de cordon ombilical; de asemenea nu este stabilita pentru diagnosticul carcinomului nazofaringian, limfomului Burkitt sau a altor limfoame asociate cu EBV.

Teste invalide (lipsa liniei de control la unul din teste invalideaza rezultatul)

Teste invalide (lipsa liniei de control la unul din teste invalideaza rezultatul)

Test Negativ

Test Pozitiv
PBHA-pozitiv

Test Pozitiv
PBHA-pozitiv
VCA IgM-pozitiv

Test Pozitiv
VCA IgM-pozitiv

Test Pozitiv
VCA IgM-pozitiv
VCA IgG-pozitiv

Test pozitiv
VCA IgM-pozitiv
VCA IgG-pozitiv
EBNA IgG-pozitiv

Test pozitiv
VCA IgG-pozitiv
EBNA IgG-pozitiv

Test pozitiv
EBNA IgG-pozitiv

Valoare de referinta: Negativ

Note:

Pentru testele imunocromatografice:

- Nu se folosesc kituri cu termen de valabilitate depasit
- Nu se folosesc casete cu invelisul deteriorat
- Kiturile si probele biologice nu se congeleaza
- Nu se folosesc probe biologice intens hemolizate, hiperlipemice sau contaminate bacterian
- Testele se executa in 2-3 ore de la prelevare sau in 24 de ore de la prelevare, in acest timp fiind mentinute la frigider la 4-8°C
- Rezultatul pozitiv trebuie confirmat, in anumite situatii , prin alte metode de exemplu ELISA.

5.6 Testul ASLO
Metoda : Latex aglutinare

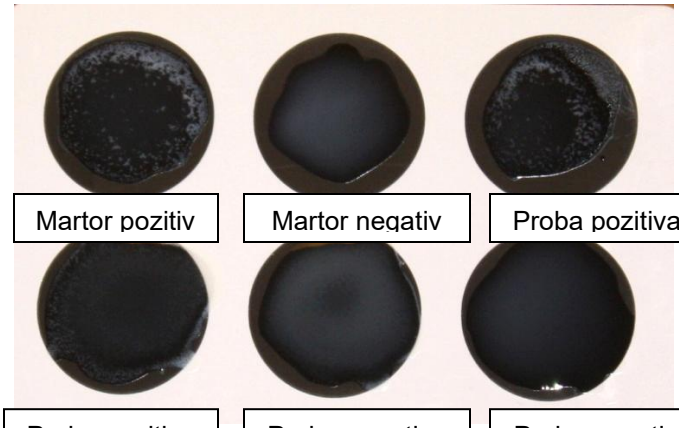
Se realizeaza cu ajutorul kitului ASLO LATEX. Este un test direct de aglutinare pe card

Reactivul care face parte din kit, contine particule de latex invelite cu streptolizina O purificata. Aceasta reactioneaza cu anticorpii prezenti in serul pacientilor si aglutineaza.

a) Testul calitativ: pe o placuta se pipeteaza o picatura de ser, peste care se pune o picatura de reactiv. Se omogenizeaza cu capatul plat al baghetei din trusa. Se agita placuta imprimand acesteia o miscare de rotatie si se citeste rezultatul in timp de doua minute. In caz de reactie pozitiva se observa aparitia glutinatelor macroscopice. Aglutinarea arata un nivel al ASLO de minim 200 UI/ml. Absenta glutinarii demonstreaza absenta anticorpilor anti-streptolizina O.

b)Testul semicantitativ: se efectueaza dilutii succesive ale probei cu urmatoarele rapoarte de dilutie: 1/2,1/3,1/4 etc. Ca diluent se poate folosi serul fiziologic. Se testeaza fiecare dilutie in parte prin procedeul descris la pct. A. Nivelul aproximativ al anticorpilor poate fi exprimat inmultind cel mai mare factor de dilutie pentru care se mai obtine reactie pozitiva de aglutinare cu 200 UI/ml (sensibilitatea reactivului).

Limite si interferente
• Titrul ASLO poate fi crescut si la unii purtatori sanatosi de streptococ betahemolitic grup A
• Numai 25% dintre pacientii cu streptococie cutanata au titrul ASLO crescut. La acesti pacienti se recomanda determinarea anticorpilor anti-DNAaza
• Tratamentul antimicrobian suprima raspunsul umoral fata de streptolizina O, de aceea testul nu este indicat la pacientii care au primit recent antibiotice.
• b-lipoproteinele din serul pacientilor cu boli hepatice neutralizeaza proprietatile hemolitice ale streptolizinei O, determinand obtinerea de rezultate fals crescute.
• In cazul specimenelor de ser contaminate cu Bacillus cereus sau Pseudomonas, b-lipoproteinele existente in produsii de crestere bacterieni neutralizeaza proprietatile hemolitice ale streptolizinei O, determinand obtinerea de rezultate fals crescute.
•In cazuri foarte rare, prezenta gamapatiei monoclonale, in special IgM (macroglobulinemia Waldenström) poate determina rezultate eronate



Testul ASLO

Exprimarea rezultatelor:

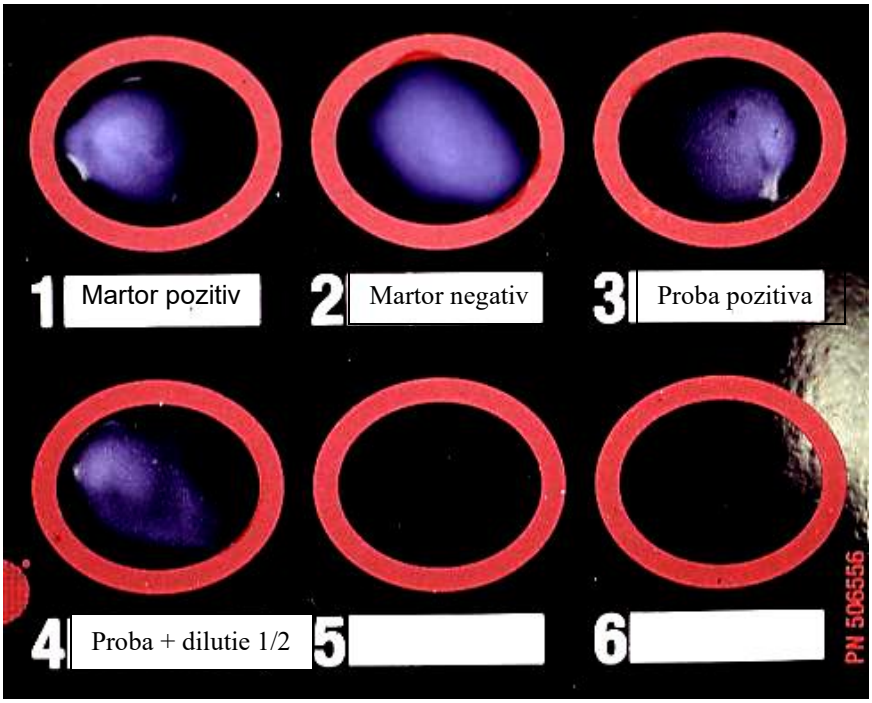
- lipsa aglutinarii vizibile in 2 minute – ASLO < 200 UI /ml
- aglutinare vizibila aparuta in mai putin de 2 minute la o dilutie cunoscuta – ASLO este dat de valoarea obtinuta din inmultirea celui mai mare factor de dilutie pentru care se mai obtine reactie pozitiva de aglutinare cu 200 UI/ml (≥ 200 UI/ml)

Valoare de referinta: < 200 UI/ml

5.7 Test CRP

Metoda latex aglutinare

Testul CRP (test calitativ si semicantitaiv tip latex) se bazeaza pe reactia imunologica dintre anticorpii fata de proteina C-reactiva legati pe particulele inerte de tip latex si CRP din proba pacientului. Cand reactivul este amestecat cu serul care contine cel putin 6 mg/l CRP dupa maxim 2 minute apar aglutinatele, iar reactia va fi considerata ca fiind pozitiva. Reactivul poate fi utilizat si pentru determinarea semicantitativa a CRP. In acest scop se fac dilutii seriale, iar fiecare dilutie este testata calitativ. Concentratia CRP poate fi estimata ca ultima dilutie cu aglutinate vizibile.



Testul CRP

Exprimarea rezultatelor:

- lipsa aglutinarii vizibile in 2 minute – CRP < 6 mg /l
- aglutinare vizibila aparuta in mai putin de 2 minute la o dilutie cunoscuta – CRP este dat de valoarea obtinuta din inmultirea celui mai mare factor de dilutie pentru care se mai obtine reactie pozitiva de aglutinare cu 6 mg/l (≥ 6 mg/l)

Valoare de referinta: < 6 mg /l

Limite si interferente

- Factorii reumatoizi din proba pot da aglutinatea reactivului latex.(se retesteaza utilizand o cantitate de 20µl din proba)
- Fenomene de prozona încep de la 80 mg/ml.

5.8 Testul FR
Metoda latex aglutinare

Test calitativ si semicantitativ tip latex, pentru determinarea factorului rheumatoid din serul uman. Reactivul contine particule latex, invelite cu gamma globulina umana. Prezenta FR in serul pacientului in concentratie de 8 UI/ml si peste, provoaca aglutinarea particulelor latex. Reactivul poate fi utilizat si pentru determinarea semicantitativa a FR. In acest scop se fac dilutii seriale, iar fiecare dilutie este testata calitativ. Concentratia FR poate fi estimata ca ultima dilutie cu aglutinate vizibile.
Rezultate:
- Rezultat Pozitiv: o aglutinatinare vizibila a particulelor de latex care apare în intervalul de 3 minute.
Un rezultat pozitiv reprezinta un nivel de Factori Reumatoizi ≥ 10 IU/ml în serul testat.
- Rezultat Negativ : nu apare aglutinare în intervalul de 3 minute.
Un rezultat negativ reprezinta un nivel de Factori Reumatoizi < 10 IU/ml în serul testat.
Test
Semicantitativ
Se va efectua în acela si mod ca i testul calitativ utilizînd probe de ser diluate anterior cu solutie salina (NaCl 9 g/l).
Nivelul aproximativ al Factorilor Reumatoiuzi din serul testat, în Unitati Internationale pe ml, va fi cel corespunzator celei mai mari dilutii cu rezultat pozitiv ; se înmulteste inversul dilut iei cu 10 IU/ml.
Exemplu: Dilutie Citire

1/ 2	+
1/ 4	+
1/ 8	-

RF = 4 x 10 = 40 IU/ml

Limite si interferente

•Diagnosticul nu trebuie sa se bazeze pe un singur rezultat pozitiv obtinut la acest test, ci trebuie corelat cu date clinice
•Complexele imune circulante prezente in serul pacientului pot produce rezultate eronate.
•Incidenta rezultatelor pozitive la subiecti aparenti sanatosi este de 3-5%.
•Reactii pozitive pot fi obtinute nu numai in poliartrita reumatoida, dar si in cazuri de mononucleoza infectioasa, hepatita, sifilis.

Valoare de referinta: < 10 UI/ ml

5.9 Test RPR

Test non-treponemic special dezvoltat pentru detectia rapida si semicantitativa , prin aglutinare pe placa a unui grup de reagene plasmatice/anticorpi ai unor componente tisulare produse de catre aproape toti pacientii infectati cu Treponema pallidum. Determinarea se face prin aglutinarea antigenului (asocierea de coplexe lipidice si particule de carbon) in contact cu reagenele prezente in proba de analizat.
Este un test calitativ si semicantitativ.
Executia testului calitativ

- Cu pipeta automata se repartizeaza 50µL proba de testat intr-un cerc de pe card.
- Este inclus obligatoriu si Controlul pozitiv.
- Cu capatul astupat si latit al baghetei se intinde picatura pe toata suprafata cercului (NU trebuie depasita limita cercului). Se arunca bagheta in dezinfectant.
- Se agita usor flaconul de repartizare cu antigen dupa care, tinandu-l in pozitie verticala, se lasa sa cada cateva picaturi in capacul flaconului (pentru eliminarea aerului din ac).
- Apoi, se repartizeaza cate o picatura de antigen in fiecare cerc, peste proba detestat si Controlul pozitiv. NU se amesteca.
- Se recupereaza antigenul din capacul flaconului.
- Card-ul se pune pe agitator, se acopera cu capac (captusit cu hartie de filtru umeda si se agita 8 min la 100rpm.
- Dupa agitare, cardul se roteste si se balanseaza scurt cu mana, pentru a reusi diferentierea rezultatelor minim reactive de cele nonreactive.
- Citirea se face macroscopic sub lumina puternica, notându-se prezenţa (indiferent de grad) sau absenţa agregarii particulelor de carbon, respectiv Reactiv / Nereactiv.

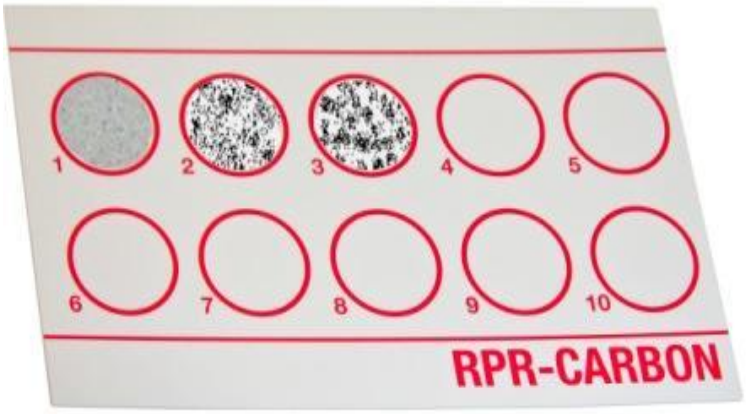
- **rezultat pozitiv**: in centrul cercului de reactie se vad agregate mari (reactie intens pozitiva) sau pe marginea cercului de reactie se vad agregate mici (reactie slab pozitiva)
- **rezultat negativ**: nu se vad agregate. Suprafata de reactie are un aspect omogen-cenusiu.

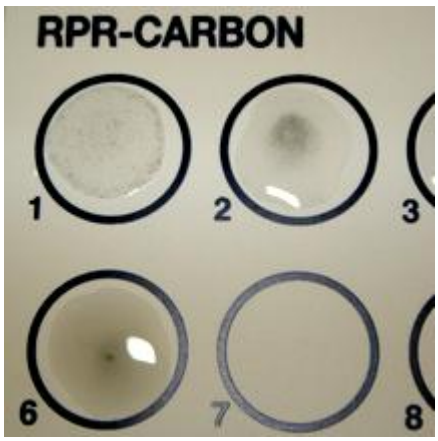
• testul cantitativ: serurile pozitive pot fi notate in functie de intensitatea reactiei. Titrul reactiei este dat de ultima dilutie la care reactia este pozitiva.

Limitele metodei

•Rezultate fals negative pot sa apara in infectii primare recente sau in cazul ultimelor stadii latente ale bolii.
•Rezultate fals pozitive pot sa apara in infectii ca mononucleoza infectioasa, lupus si pneumonie virala.
•Sarcina, consumul de narcotice si bolile autoimmune de asemenea pot prezenta rezultate fals positive
• Rezultatul pozitiv trebuie confirmat prin TPHA
•Testul RPR nu se foloseste pentru LCR.
• Poate sa apara ocazional reactie de prozona. Fenomenul de prozona (inhibitia completa sau partiala a reactivitatii), apare cu serul nediluat; maximum de reactivitate se obtine numai cu serul diluat. Fenomenul de prozona poate fi atat de pronuntat incat in testul calitativ poate sa apara doar un aspect usor grunjos (rough) la un ser, care diluat, are o reactivitate puternica. Toate probele de ser, care la testul RPR calitativ dau o reactie cat de cat grunjoasa, trebuie retestate prin procedura cantitativa.
•Testul RPR poate fi pozitiv la persoane din tari in care sunt endemice sifilisul nevenerian, pinta, pian.
• Ocazional, fata de antigene cardiolipinice pot sa apara reactii biologic fals pozitive , in special la persoane care folosesc droguri; care au boli cum ar fi lupusul eritematos, mononucleoza, lepra, pneumonii virale sau care au fost vaccinate recent.

Valoare de referinta: Negativ





Note:

Pentru testele prin latex aglutinare:

- Nu se folosesc kituri cu termen de valabilitate depasit
- Kiturile si probele biologice nu se congeleaza
- Nu se folosesc probe biologice intens hemolizate, hiperlipemice sau contaminate bacterian

- Testele se executa in 2-3 ore de la prelevare sau in 24 de ore de la prelevare, in acest timp fiind mentinute la frigider la 4-8°C
- Inainte de utilizare reactivii latex se omogenizeaza.
- Totdeauna se folosesc martorii Pozitiv si Negativ din kit

6. CONTROL DE CALITATE

Teste imunocromatografice:

- Control intern de procedura este inclus in test; linia colorata aparuta in zona „C", se considera ca fiind control de procedura intern si confirma volumul suficient de proba si procedura tehnica corecta
- Comparare interpersonala privind interpretarea testului (a doua opinie)
- Compararea cu rezultatele obtinute prin alte metode, exemplu prin metoda ELISA

Teste latex aglutinare:

- Control intern de procedura inclus in test folosind martorii kitului (Pozitiv si Negativ)
- Comparare interpersonala privind interpretarea testului (a doua opinie)
- Compararea cu rezultatele obtinute de alte laboratoare din aceeasi proba biologica

7.RESPONSABILITATI INREGISTRARI

Procedura este efectuata de catre MEDIC RESPONSABIL ANALIZA.
Verificarea procedurii este efectuata de catre seful de laborator.

8. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne / externe- pentru probele acceptate cod : RGL 4.4. 01 I E
- Registrul de comenzi respinse- pentru probele necorespunzatoare cod : RGL 4.4-02
- Registre de analiza compartiment Imunologie:
  cod : RGL-4.4-01K ASLO
  cod : RGL-4.4-01K CRP
  cod : RGL-4.4-01K RPR
  cod : RGL-4.4-01K Teste rapide
- Buletin de analiza cod : FGL- 5.8 - 01

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICĂ

IDENTIFICAREA MICROORGANISMELOR

COD: POL – M1 - 01

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborilă

ELABORAT
Dr. Olga Filip

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1.SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ
4. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
5.1. CONDIŢII PREALABILE
5.2. RESURSE NECESARE
5.3. CONŢINUTUL PROCEDURII (EXECUŢIA ANALIZEI, ACTIVITĂŢI)
5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
5.5. ACTIVITĂŢI FINALE
6. RESPONSABILITĂŢI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

1. SCOPUL

Procedura descrie principalele teste biochimice şi de mobilitate folosite în identificarea tulpinilor izolate din produse biologice.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecţioase „Sf. Parascheva" Iaşi.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- MANUALUL CALITATII , Cod: MCL – 01
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguţ,Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,Bucureşti, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977

4.DEFINITII SI ABREVIERI

4.1.Definiţii

Identificarea biochimică se bazează pe studiul activităţii enzimatice a microorganismelor din cadrul metabolismului energetic şi catabolismul glucidic, proteic sau lipidic.

4.2. Abrevieri

TSI = Triple Sugar Iron Agar
MIU = Mobilitate Indol Ureaza
FA = Fenil – alanin - dezaminaza
OX = Oxidaza
OF = Test oxidare – fermentare
L = Lactoza

AC = acid
AL = alcalin

5. DESCRIEREA PROCEDURII

5.1. Condiţii prealabile

Operatorul care efectuează analiza va purta echipament de protecţie si va respecta normele de protecţia muncii si de lucru specifice laboratorului.

Pregătirea materialelor de laborator

Mediile de cultură,coloranţii se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri şi recipiente şi apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice , conform IL- , Ed.1, Rev0/.....

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticluţe, flacoane) este pregatită pentru utilizare de către asistentul de laborator conform IL- , Ed.1, Rev0/.....

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură şi sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2- 3 zile şi se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură şi în cutii cu capac eprubetele, sticluţele şi lamele.

5.2. Resurse necesare

Echipamente

-hota cu flux laminar
-termostat
-frigider
-lampa UV
-microscop optic

Resurse

-anse;
-lame microscop;
-ulei de parafina
-bec de gaz Bunsen;
-baie colorare;
-cutii Petri;
-tampoane exsudat;
-densimat/scala nefelometrica Mc Farland;
-pense;
-pipete automate;
-pipete sterile;
-varfuri albastre si galbene pentru pipete automate;
-cristalizor/recipiente pentru solutii dezinfectante;
-lame/lamele;
-eprubete sterile de 10/10;
-stative eprubete;
-containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

5.3. Continutul procedurii

5.3.1. Teste enzimatice folosite în identificarea cocilor gram-pozitivi aerobi-facultativ anaerobi

Testul catalazei

Principiu: prezenţa catalazei determină descompunerea peroxidului de hidrogen în apă şi oxigen care se degajă sub formă de bule.

$2\ H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

Testul permite diferenţierea cocilor gram-pozitivi care posedă catalază din genurile *Staphylococcus* şi *Micrococcus* de cei catalazo-negativi din genurile *Streptococcus* şi *Enterococcus.*

Tehnica de lucru: se depune pe o lamă de microscop o picătură de H_2O_2 în care se dispersează 1-2 colonii din cultura de testat, prelevate cu un beţişor din lemn. Se evită practicarea testului cu ansa metalică sau pe culturi dezvoltate pe geloză sânge întrucât pot conduce la rezultate fals pozitive.

Citire şi interpretare

- test pozitiv: degajare de bule de gaz până la efervescenţă
- test negativ: lipsă de bule după dispersia coloniilor

Control de calitate

- martor pozitiv: *Staphylococcus aureus*
- martor negativ: *E. faecalis*

Testul coagulazei

Principiu: dintre tulpinile de interes medical, numai tulpinile de *S. aureus* coagulează plasma de iepure sau om prin doi factori care cel mai frecvent coexistă:

- **coagulaza liberă**, enzimă extracelulară care activează un factor plasmatic similar trombinei şi este pusă în evidenţă prin testul la tub;
- **coagulaza legată** de peretele celular (*clumping factor*) care acţionează direct asupra fibrinogenului şi este detectată prin testul pe lamă.

a. Efectuarea testului pe lamă

Tehnica de lucru: se efectuează o suspensie suficient de densă într-o picătură de apă distilată din tulpina de testat; dacă nu apare o autoaglutinare, se adaugă o picătură de plasmă de om, obţinută după centrifugarea sângelui recoltat pe EDTA, proaspătă sau conservată la frigider.

Citire şi interpretare

- test pozitiv: formare de aglutinate în interval de 15-20 sec;
- absenţa aglutinării; testul negativ necesită a fi confirmat prin testul la tub.

b. Efectuarea testului la tub

Tehnica de lucru: se repartizează 0,5 ml plasmă de om diluată 1/5 în eprubetă 10/100, în care se realizează o suspensie din cultura de identificat, urmată de incubare la 35^0 C 37^0 Ctimp de 4-18 ore.

Citire şi interpretare

- test pozitiv: coagul prezent (în masă sau văl de fibrină) după incubare la 35^0C timp de 4 ore sau după reincubare până la 18 ore → *S. aureus*;

- test negativ: absenţa cheagului → stafilococ coagulazo-negativ.

Control de calitate

- martor pozitiv: *S. aureus*
- martor negativ: *S. epidermidis*

c. Utilizarea truselor comercializate

Identificarea rapidă a speciei se face cu ajutorul reactivilor comerciali de aglutinare. Reactivii sensibilizaţi cu fibrinogen si IgG cuplează coagulaza legată, respectiv proteina A din peretele *S. aureus*, ducând la aglutinarea amestecului dintre reactiv şi cultura de *S. aureus*.

Testarea sensibilităţii la Novobiocină

Principiu: *S. saprophyticus*, spre deosebire de alţi stafilococi coagulazo-negativi de interes medical, este rezistent la Novobiocină.

Efectuarea testului: suspensia cu densitatea 0,5 McFarland din tulpina de testat este însămânţată pe mediul Mueller-Hinton folosind tehnica pentru efectuarea antibiogramei, apoi se depune un microcomprimat de Novobiocină (5 µg); incubare la 35^0C în aerobioză timp de 16-18 ore.

Citire şi interpretare

- tulpină sensibilă: diametrul zonei de inhibiţie > 16 mm (sau conform instructiunilor producatorului);
- tulpină rezistentă: diametrul ≤ 16 mm → *S. Saprophyticus* (sau conform instructiunilor producatorului).

Control de calitate

- martor pozitiv: *S. saprophyticus*
- martor negativ: *S. epidermidis*

Testarea sensibilităţii la Bacitracină

Principiu: *S. pyogenes* (streptococ grup A) este sensibil la concentraţii joase de bacitracină (0,04 U) în timp ce alţi streptococi β-hemolitici sunt rezistenţi. Aproximativ 1% din tulpinile de *S. pyogenes* pot fi rezistente şi 5-10% din ceilalţi streptococi β-hemolitici pot fi sensibili.

Efectuarea testului: se preleva cu ansa 3-4 colonii beta hemolitice si se însămânţează tulpina de testat pe un sector de agar sânge în striuri dese, în 3 direcţii suprapuse pentru a se obţine o creştere confluentă; se depune apoi în centrul inoculului un microcomprimat cu bacitracină 0,04 U sau 0,1 U. Incubare la 35^0C timp de 18 ore.

Citire şi interpretare

- test pozitiv: orice zonă de inhibiţie a creşterii în jurul discului cu bacitracină de 0,04 U sau un diametru >11 mm in jurul discului cu 0.1 U bacitracină indică *S. pyogenes*;
- test negativ: cultivare până la marginea discului cu bacitracină un diametru <11 mm in jurul discului cu 0.1 U bacitracină indică alţi streptococi β-hemolitici.

Control de calitate:

- martor pozitiv: *S. pyogenes*;
- martor negativ: *S. agalactiae*.

Testarea sensibilităţii la optochin

Principiu: majoritatea tulpinilor de *S. pneumoniae* sunt sensibile la optochin (etilen-hidrocupreină), spre deosebire de streptococii viridans care sunt rezistenţi.
Efectuarea testului: se însămânţează tulpina de testat pe un sector de agar sânge în striuri dese, în 3 direcţii suprapuse pentru a se obţine o creştere confluentă; se depune apoi în centrul inoculului un microcomprimat cu optochin (5 µg). Incubare la 35^0C în atmosferă cu 5% CO_2 timp de 18-24 ore.
Citire şi interpretare

- tulpină sensibilă (test pozitiv) : diametrul zonei de inhibiţie ≥14 mm*)*→ *S. pneumoniae* ;
- tulpină rezistentă (test negativ): diametrul < 14 mm *)*.

Control de calitate

- martor pozitiv: *S. pneumoniae*
- martor negativ: streptococ viridans

Testul cu bilă-esculină
Principiu: Enterococii şi streptococii de grup D cresc pe mediul cu 40% bilă şi hidrolizează esculina cu eliberare de glucoză şi esculetină; esculetina reacţionează cu citratul de fier din mediu şi formează un compus de culoare neagră.
Efectuare: se însămânţează tulpina de identificat pe mediul bilă-esculină turnat în pantă în eprubete 10/100. Incubează la 35^0C timp de 18-24 ore şi încă 24 ore dacă testul este negativ.
Citire şi interpretare

- test pozitiv: cultivarea tulpinii şi înnegrirea mediului → *Enterococus* sp. şi streptococi din grupul D;
- test negativ: lipsa de înnegrire a mediului; numai cultivarea nu constituie un rezultat pozitiv.

Control de calitate

- martor pozitiv: *Enterococcus faecalis*
- martor negativ: streptococ viridans

5.3.2. Teste biochimice şi de mobilitate folosite în identificarea bacililor gram-negativi aerobi şi facultativ anaerobi

Mediul T.S.I.
Principiu: mediu multitest folosit în identificarea bacililor gram-negativi din familia *Enterobacteriaceae*, care conţine glucoză (0,1%), lactoză şi zaharoză (1%), sulfat feros, tiosulfat de sodiu şi roşu fenol ca indicator de pH. Mediul este repartizat în eprubete de 12/120 mm în coloană (2,5-3cm) şi în pantă; permite evidenţierea următoarelor caractere:

- fermentarea glucozei cu sau fără producere de CO_2 prin virarea în galben a coloanei cu sau fară prezenţa de bule sau fragmentarea coloanei;
- fermentarea lactozei şi/sau zaharozei cu virarea în galben a pantei;
- producerea de H_2S din descompunerea tiosulfatului de sodiu pus în evidenţă cu sulfatul feros ca indicator, prin înnegrirea mediului.

Însămânţare şi incubare: o colonie este repicată cu ansă cu buclă mică şi însămânţată prin inteparea mediului dispus in coloana si apoi pe suprafata pantei în striuri paralele. Incubare la 35^0C timp de 18-24 ore.

Citire şi interpretare: se înregistrează fermentarea sau nu a lactozei şi/sau zaharozei în pantă (AC sau AL), urmată de confirmarea sau infirmarea fermentării glucozei în coloană (AC sau AL) şi la sfârşit producerea sau nu de H_2S. Apar 5 situaţii distincte:

AL/AC H_2S+; AL/AC H_2S-; AC/AC H_2S+; AC/AC H_2S-; AL/AL.

Primele 4 profile orientează efectuarea unor teste adiţionale biochimice pentru identificarea la nivel de gen sau specie (schema de identificare din anexa 3). Ultimul profil exclude prezenţa unui bacil gram-negativ din familia *Enterobacteriaceae*.

Control de calitate

AL/AC H_2S+: *Proteus mirabilis*
AL/AC H_2S-: *Shigella sonnei*
AC/AC H_2S-: *Escherichia coli*
AC/AC cu H_2S+: *Citrobacter freundii*
Al/AL: *Pseudomonas aeruginosa*

Mediul cu manită şi uree

Indicaţii: Triajul biochimic al *Enterobacteriaceae*-lor prin testarea producerii de urează, manită şi a mobilităţii.

Principiu

Proba: Colonii bine izolate şi cu aspect sugestiv din primocultura pe medii selective ori diferenţiale sau din primoculturi pure pe medii neselective.

Procedura: Prelevă cu firul de însămânţare o porţiune de colonie (de pe medii selective exclusiv de la suprafaţa coloniei). Însămânţează prin înţepare coloana de mediu. Incubează peste noapte la 37°C, iar tuburile nevirate în continuare până la 48 ore.

Citire şi interpretare:

- Opacifiere numai în lungul traiectului de însămânţare = bacterie imobilă.
- Coloana de mediu opacifiată = bacterie mobilă.
- Coloana alcalinizată (albastră) = urează prezentă.
- Culoarea coloanei de mediu nemodificată = urează absentă.
- Virarea mediului in galben = manită pozitiv
- Culoarea coloanei de mediu nemodificată =manită negativ

Controlul de calitate:

Proteus mirabilis: mobilă, urează şi indol pozitivă.
Shigella sonnei: imobilă, urează şi indol negativă.

Test indol

Principiu:

Bacilii gram negativi care hidrolizează triptofanul produc indol, un produs care dezvoltă o culoare roşie prin adăugare de reactiv Kovacs (para-dimetilaminobenzaldehidă în alcool).

Însămânţare şi incubare: se însămânţează tulpina de identificat în apa peptonată repartizată în eprubete de 12/120; incubare la 35^0C timp de 18-24 ore.

Citire şi interpretare

Producerea de indol:

Se adaugă câteva picături reactiv Kovacs fără agitare, cu citirea reacţiei după 1 min.

- dezvoltarea în faza alcoolică superioară a culorii roşu-rubiniu → tulpină indol-pozitivă;
- faza alcoolică rămâne incoloră → tulpină indol-negativă.

Control de calitate

- indol-negativ: *Proteus mirabilis*
- indol-pozitiv: *Escherichia coli*

Decarboxilarea lizinei

Principiu: bacilii gram-negativi din familia *Enterobacteriaceae*, care descompun lizina, fermentează iniţial glucoza şi crează un pH acid favorabil pentru acţiunea lizin-decarboxilazei care, în a doua fază, alcalinizează mediul prin aminele generate, cu intensificarea culorii purpurii a indicatorului bromcrezol purpur.

Însămanţare şi incubare: mediul cu lizină, repartizat în volum de 2-3 ml în eprubete de 10/100 mm este însămânţat cu tulpina de identificat. Incubare la 35^0C cu examinare zilnică până la 4 zile.

Citire şi interpretare:

- test pozitiv: mediul cu lizină virează în purpuriu;
- test negativ: mediul cu lizină virează în galben.

Control de calitate

- martor pozitiv: *Salmonella enteritidis*
- martor negativ: *Proteus mirabilis*

Producerea de fenilalanindezaminază

Principiu: *Proteus, Morganella* şi *Providencia* produc în mod caracteristic această enzimă care dezaminează fenilalanina cu generare de acid fenilpiruvic; prin adăugare de clorură ferică (soluţie 10%) se dezvoltă o culoare verde.

Însămânţare şi incubare: mediul cu fenilalanină repartizat în pantă în eprubete de 10/100mm este însămânţat abundent cu tulpina de identificat cu incubare la 35^0C timp de 18-24 ore.

Citire şi interpretare: se depun 4-5 picături de clorură ferică pe suprafaţa culturii:

- test pozitiv: suprafaţa pantei şi lichidul de la baza pantei se colorează în câteva secunde în verde;
- test negativ: absenţa culorii verzi.

Control de calitate

- martor pozitiv: *Proteus vulgaris*
- martor negativ: *Escherichia coli*

Utilizarea citratului

Principiu: unii bacili gram-negativi din familia *Enterobacteriaceae* pot utiliza citratul de sodiu ca unică sursă de carbon într-un mediu sintetic minimal pe care cresc şi îl alcalinizează, cu virarea indicatorului albastru de brom-timol (mediul Simmons).

Insămânţare şi incubare: se însămânţează pe suprafaţa mediului un striu din tulpina de identificat; incubare la 35^0C cu examinare zilnică până la 7 zile.

Citire şi interpretare:

- test pozitiv: striu de cultură şi culoarea albastră a mediului;
- test negativ: absenţa culturii cu lipsa de virare a indicatorului (culoarea verde a mediului se menţine).

Control de calitate

- martor pozitiv: *Klebsiella pneumoniae*
- martor negativ*: Escherichia coli*

Testul de mobilitate

Principiu: o tulpină însămânţată prin înţepare într-o coloană de mediu semisolid (agarizat 0,4%), cultivă numai pe traiectul de însămânţare dacă este imobilă sau difuzează în afara striului invadând mediu dacă este dotată cu flageli.
Însămânţare şi incubare: însămânţează coloana de agar prin înţepare cu firul drept şi incubează mediul la 35^0C timp de 24-48 ore.
Citire şi interpretare
- test pozitiv (bacterie mobilă): opacifierea progresivă a mediului în afara traiectului de însămânţare,
- test negativ: cultivarea strictă pe traiectul de însămânţare.

Control de calitate
- martor pozitiv: *Salmonella* Enteritidis
- martor negativ: *Klebsiella pneumoniae*.

Testul oxidazei
Principiu: citocrom-oxidaza, enzimă respiratorie prezentă la bacterii gram-negative aerobe, facultativ anaerobe sau microaerofile, în prezenţa tetrametil-parafenilendiaminei, generează un compus de culoare purpurie.
Procedură: o colonie dintr-o cultură de 24-48 ore dezvoltată pe un mediu fără zaharuri în compoziţie, prelevată cu ansa din plastic sau cu un beţişor din lemn este etalată în spot pe suprafaţa unei benzi impregnate cu reactiv.
Citire şi interpretare
- test pozitiv: virajul spotului în culoare purpuriu închis în interval de 10-15 sec.
- test negativ: absenţa culorii purpurii în primele 20 sec.

Control de calitate
- martor pozitiv: *Pseudomonas aeruginosa*
- martor negativ: *Escherichia coli*

Testul de oxidare-fermentare (OF)
Indicaţii: Diferenţierea corinebacteriilor şi genurilor înrudite, *Enterobacteriaceae*-lor aeromonadelor, pseudomonadelor şi altor bacterii gram-negative nefermentative.
Principiu: Bacteriile pot cataboliza glucoza fermentativ şi/sau oxidativ, acidul piruvic fiind intermediarul cheie al ambelor căi metabolice. În fermentare transferul de electroni de la acidul piruvic la alţi compuşi organici generează mai mulţi acizi care determină o importantă scădere de pH. În oxidare, acidul piruvic este antrenat în ciclul Krebs, iar transferul de electroni se face către oxigen cu apariţia în final a apei. Acizii generaţi în ciclul Krebs sunt acizi slabi, care determină, comparativ cu acizii generaţi în fermentaţie, numai o uşoară acidifiere a mediului.

Hugh şi Leifson au conceput mediul OF tocmai pentru a surprinde aceste variaţii ale pH-ului în raport cu calea de catabolizare oxidativă sau fermentativă a glucozei: (1) Conţinutul scăzut de peptonă previne formarea de amine alcaline care ar putea neutraliza acizii din ciclul Krebs, (2) Conţinutul 1% de glucoza generează suficienţi acizi în calea oxidativă pentru a determina o scădere de pH sesizabilă prin albastrul de bromtimol inclus ca indicator. (3) Semigelificarea cu agar 0,3% localizează satisfăcător acizii formaţi. (4) Utilizarea în paralel a două tuburi, dintre care unul are mediul acoperit cu ulei de parafină, iar celălalt mediul în contact direct, cu oxigenul asigură condiţii anaerobe, favorabile fermentării şi, respectiv aerobe, favorabile oxidării.
Proba: Colonii din cultura pură pe mediul agarizat.

Procedura: Regenerează, pentru îndepărtarea aerului, un set dublu de tuburi faţă de numărul tulpinilor testate. Răceşte brusc şi însămânţează prin înţepare cu firul drept în profunzimea coloanei fiecare tulpină în două tuburi. Incubează un set de tuburi aerob, celălalt anaerob sub strat de ulei mineral steril de 1,5-2cm înălţime. Urmăreşte tuburile zilnic timp de 14 zile.

Citire şi interpretare:

Rezultatul	Tubul aerob	Tubul anaerob
Oxidare	acid	fără acidifiere
Fermentare	acid	acid
Inactiv	fără acidifiere	fară acidifiere

Mediul O-F depistează de asemenea producerea de gaz din glucoza şi mobilitatea.

Controlul de calitate:

Oxidare: *Acinetobacter calcoaceticus/Burkholderia cepacia.*
Fermentare: *Escherichia coli.*
Inactiv: *Alcaligenes faecalis/Acinetobacter lwoffii.*

Testul de filamentare

Se suspensionează câteva colonii de levuri într-o eprubetă ce conţine 0,5 ml ser sanguin. Se agită, se lasă la termostat 2-3 ore, se efectuează un preparat lamă-lamelă din suspensia obţinută şi se urmăreşte la microscop apariţia tubilor germintivi (filament care emerg din blastospor fără strangulare).

Candida albicans dă testul de filamentare pozitiv.

5.4. ACTIVITATI FINALE

- plăcile din plastic cu culturi bacteriene sunt colectate în saci din plastic de culoare galbenă şi apoi transportate la incinerator;
- materialele din sticlă recuperabile (plăci Petri, eprubete) sunt sterilizate, după folosire; la autoclav, spălate şi reintroduse în circuit.

6. RESPONSABILITĂTI

6.1. Responsabilul de analiză

Citeşte şi consemnează rezultatele testelor biochimice şi le interpretează în contextul unor teste suplimentare de identificare (caractere morfo-tinctoriale, mobilitate, fenotipuri de rezistenţă la antibiotice);

6.2. Asistentul de laborator

Repartizează mediile de identificare şi răspunde de asigurarea parametrilor fizici şi de sterilitate.

Asigură conservarea mediilor în condiţii corespunzătoare până în momentul utilizării.

Efectuează testele biochimice de identificare.

6.3. Personalul de ingrijire

Execută şi întreţine curăţenia în laborator;
Colectează şi depozitează reziduurile de probe şi deşeurile auxiliare.

7. INREGISTRARI

- registre de analiză;
- buletin de analiză FGL-5.8-01

8. ANEXE

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA OPERAŢIONALĂ

COLORAREA FROTIURILOR

COD: POL – M1 - 02

Ediţia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborilă

ELABORAT
Dr. Olga Filip

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager General	1.		Prof.Dr. Carmen Dorobăţ					
Manager Tehnic	2		Dr. Rodica Fântânaru					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1.SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ
4. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
5.1. CONDIŢII PREALABILE
5.2. RESURSE NECESARE
5.3. CONŢINUTUL PROCEDURII (EXECUŢIA ANALIZEI, ACTIVITĂŢI)
5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
5.5. ACTIVITĂŢI FINALE
6. RESPONSABILITĂŢI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

1. SCOPUL

Procedura descrie modul de realizare a coloratiilor in microbiologie.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecţioase „Sf. Parascheva" Iaşi.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- MANUALUL CALITATII
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguţ,Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,Bucureşti, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977
- Prospectele truselor de reactivi si coloranti

4.DEFINIŢII SI ABREVIERI

4.1.Definiţii

Frotiul reprezintă materialul microbian etalat in strat subtire pe suprafaţa unei lame de microscop.

4.2. Abrevieri

ZN = Ziehl- Neelsen
BAAR = bacili acido- alcoolo-rezistenti

5. DESCRIEREA PROCEDURII

Pentru efectuarea frotiului se folosesc lame curate şi degresate care se marchează la una dintre extremităţi cu indicativul produsului ce urmează a fi examinat.

Efectuarea propriu-zisă a frotiului are trei timpi:

a) etalarea:

-se etalează o ansă din produsul patologic fluid sau din cultura bacteriană în mediu lichid în strat subţire şi uniform pe 1-2 cm^2 în centrul lamei, cu mişcări lente ale ansei.

-în cazul exsudatelor fibrino-muco-purulente etalarea unui flocon se realizează prin mişcări circulare concentrice spre exterior, evitând dilacerarea structurilor celulare prin mişcări de du-te-vino ale ansei.

-când produsul biologic este prelevat pe tampon, se rulează tamponul pe suprafaţa lamei, evitând distrugerea elementelor celulare prin exercitarea unor presiuni prea mari în timpul efectuării frotiului

-în cazul culturii bacteriene pe medii solide se realizează o suspensie omogenă din colonia bacteriană de testat într-o picătură de soluţie salină izotonă depusă în centrul lamei, care apoi se etalează în strat subţire

- în cazul fragmentelor de ţesuturi se efectuează amprente: pe suprafaţa de secţiune a ţesutului se aplică lama in aşa fel încât pe porţiunea ei centrală să rămână amprenta tesutului

b) uscarea: la temperatura camerei sau de preferat pe o suprafaţă încălzită (ce nu depăşeşte 70ºC)
c) fixarea prin căldură: lama cu frotiul uscat în sus este trecută de câteva ori prin flacăra unui bec de gaz timp de 5-10 sec. Temperatura de fixare nu trebuie să fie prea ridicată pentru a nu distorsiona elementele structurale ale bacteriilor (temperatura lamei trebuie sa fie suportabilă când o atingem pe tegumentul feţei dorsale a mâinii).

Pentru studierea caracterelor microscopice (dimensiuni, formă, aşezare) şi identificarea afinităţii tinctoriale a bacteriilor prezente în produsele patologice sau a celor izolate pe mediile de cultură sunt examinate frotiuri colorate prin diferite tehnici de colorare:

- Coloraţia simplă cu albastru de metilen
- Coloraţţa diferenţială Gram

5.1. Coloraţia simplă cu albastru de metilen

Frotiurile din produs patologic sau din coloniile izolate pe mediile de cultură se acoperă cu soluţie de albastru de metilen, se lasă timp de 1 minut, apoi se spală cu apă (până când apa de spălare curge curată), se usucă la temperatura camerei şi se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie.

Citirea şi interpretarea:

Bacteriile apar colorate în albastru închis; celulele inflamatorii şi cele de descuamare cu nuanţe de albastru, mai închis nucleul, deschis citoplasma.

5.2. Coloraţia diferenţială Gram

Principiu:

După tratarea bacteriilor cu un colorant bazic violet din seria pararozanilinei şi cu iod, ele se comportă diferit sub acţiunea unui agent decolorant (alcool, acetona).

La unele iodul fixează colorantul şi împiedică decolorarea, astfel încât bacteriile rămân colorate în violet şi au fost denumite gram pozitive.

Alte bacterii se decolorează şi trebuie colorate cu un colorant diferit, uzual roşu (fuxină, safranină) şi se numesc gram negative.

Procedura

Frotiurile efectuate din produse patologice sau din coloniile izolate pe mediile de cultură se colorează prin tehnica Gram respectând următoarele etape ale coloraţiei:

a) colorarea cu soluţie de violet de metil timp de 1 minut;

b) spălare cu apă;
c) fixare cu soluţie iodo-iodurată Lugol: acoperirea lamei cu soluţie şi menţinerea timp de 2 minute, apoi scurgerea soluţiei de pe lamă (fără spălare);
d) decolorarea cu un amestec de alcool etilic (96º) şi acetonă (100%), timp de 5-10 secunde (în funcţie de grosimea frotiului): se acoperă lama cu amestecul decolorant şi se imprimă mişcări alternative de înclinare până când preparatul nu mai eliberează colorant;
e) spălare cu apă;
f) recolorarea cu fucsină bazică 0,1% timp de 30 secunde, prelungit până la 1-2 minute pentru colorarea hemofilior.;
g) spălare cu apă, uscare.

Controlul de calitate:

Martor pozitiv: *S. aureus* ATCC 25923
Martor negativ: *E. coli* ATCC 25922

Pentru fiecare lot nou de colorant sau amestec decolorant se efectuează, colorează şi examinează un frotiu martor. Acesta se realizează dintr-o suspensie de *E. coli* si *S. aureus* din culturi proaspete de o zi, iar pe acest frotiu diferenţa dintre bacilii gram-negativi şi cocii gram-pozitivi trebuie sa fie netă.

Citirea şi interpretarea:

- bacteriile gram-pozitive şi fibrina apar colorate în violet;
- bacteriile gram-negative, în roşu,
- nucleul şi citoplasma celulelor inflamatorii şi celulelor tisulare, în nuanţe de roşu. Pe frotiurile etalate neuniform, pot alterna câmpuri sub- sau supradecolorate.Se selectează pentru examinare câmpurile cu leucocite roşii; dacă alături de acestea se observă bacterii violete, câmpul este corect diferenţiat.

5.3. Coloratia Ziehl-Neelsen

Indicaţii

Coloraţia micobacteriilor din produse patologice sau din cultură.

Reactivi

- Soluţia de fucsină fenicată Ziehl
- Solutia decolorantă 20% de acid sulfuric
- Alcool etilic 95º
- Soluţia recolorantă : albastru de metilen Loffler.

Procedura

- Se acoperă lama cu soluţie de fucsină Ziehl.
- Cu lampa de spirt se încălzeşte faţa inferioară a lamei până la emitere de vapori. Se repetă încălzirea la intervale de un minut timp de 5 minute.
-Se spală lama abundent cu apă de la robinet
- Se acoperă lama cu soluţie de acid sulfuric 20% timp de 1 minut. Culoarea roşie a frotiului devine galben brună. După un minut se varsă decolorantul şi se spală lama. Frotiul trebuie să rămână uşor roz. La nevoie, se poate repetă acest timp.
-Se spală bine cu apa de robinet.

Se recolorează frotiul cu albastru de metilen Loffler timp de un minut.
Se spală cu apa de robinet şi se usucă.

Citire si interpetare
Bacilii acido alcoolo-rezistenti apar roşii strălucitori.
Celulele inflamatorii, celulele de descuamare şi bacilii neacido-rezistenţi în nuanţe de albastru.

Controlul de calitate
Martor pozitiv : *Mycobacterium tuberculosis*
Martor negativ : *Corynebacterium* spp
Rezultate fals pozitive apar în cazul existenţei de micobacterii saprofite în conductele şi rezervoarele de apă sau in soluţii păstrate in laborator.

5.4. Coloraţia Giemsa rapidă

Indicatii
Evidenţiază *Pneumocystis* (în sediment de spălătură bronşică), *Histoplasma capsulatum* (în puroi, sediment de spută), incluzii de *Chlamydia trachomatis* in prelevate de la bolnavi.

Reactivi
- fixator : alcool metilic absolut
- Colorant Giemsa soluţie stoc
- Dilutia 1/20 a solutiei Giemsa preparată zilnic.

Procedura
Se usucă frotiurile 30 minute in aer.
Se fixează cu alcool metilic absolut timp de un minut.
Se scurge şi se usucă in aer.
Se colorează timp de 30 minute cu dilutţa de lucru a soluţiei Giemsa.
Se clateste cu apa.
Se usucă in aer şi se examinează.

Citire şi interpretare

Pneumocystis carinii – formele trofice apar cu nucleul roşu şi citoplasma albastră.Chiştii rămân cu peretele necolorat, vizibil doar ca un halou, dar nucleii lor apar roşii.

Histoplasma capsulatum apare în citoplasma macrofagelor sau polimorfonuclearelor ca levuri colorate in roşu.
În exsudatele bronhoalveolare, coloraţia Giemsa mai poate evidenţia : *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatidis*, *Coccidioides immitis*.

Incluziunile de Chlamydia trachomatis trebuie căutate in celulele epiteliale columnare. Iniţial apar albastre, iar la maturitate devin roşii, cresc în volum au aspectul unei vezicule citoplasmice compacte, care deplasează nucleul celulei la periferie.

Controlul de calitate

Prin depistarea macrofagelor alveolare şi a celulelor bronsice , coloraţia Giemsa permite controlul de calitate al spălăturii bronhoalveolare pentru depistarea fungilor şi a altor paraziţi.

6. RESPONSABILITĂŢI

6.1. Responsabilul de analiză
- examinează frotiurile colorate şi consemnează rezultatele în caietele de lucru
- verifică inscrierea rezultatelor in buletinul de analiză, pe care îl semnează şi parafează.
- înregistrează rezultatele în registrul în care sunt înscrise probele primite în laborator

6.2. Asistentul
- efectuează frotiurile şi colorarea lor
- asigură dezinfecţia suprafeţelor de lucru

7. ÎNREGISTRĂRI

- registre de analiză;
- buletin de analiză

8. ANEXE

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICĂ

EXAMEN LICHIDE DE PUNCŢIE

COD: PSL – M1 - 01

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Sef compatiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

ELABORAT
Dr. Olga Filip

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1.SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ
4. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
5.1. CONDIŢII PREALABILE
5.2. RESURSE NECESARE
5.3. CONŢINUTUL PROCEDURII (EXECUŢIA ANALIZEI, ACTIVITĂŢI)
5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
5.5. ACTIVITĂŢI FINALE
6. RESPONSABILITĂŢI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

1. SCOPUL

Procedura descrie activităţile şi etapele privind prelucrarea lichidelor de puncţie (lichidul cefalorahidian, pleural, pericardic, articular si peritoneal) în scopul stabilirii diagnosticului etiologic în meningo-encefalite, artrite, pleurezii, pericardite si peritonite.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecţioase „Sf. Parascheva" Iaşi.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- MANUALUL CALITATII , Cod: MCL – 01
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguţ,Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,Bucureşti, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977

4.DEFINITII SI ABREVIERI

4.1.Definitii

4.1.1. Lichid cefalorahidian: produs biologic/ patologic obţinut prin rahicenteză, uzual lombară sau puncţie ventriculară, in condiţii aseptice. LCR normal e un fluid steril, incolor si clar, care conţine cel mult 3 celule nucleate/mmc, 50-70 mg glucoză/dl, 15-40 mg proteine/dl si 680-730 mg cloruri/dl. Se recoltează de către clinician, la patul bolnavului, de preferat înainte de administrarea antibioticelor.

După prezentarea clinică, meningitele bacteriene pot fi acute (când debutul simptomelor este cu cel mult 24 ore in urmă) sau cronice (simptomatologia durează minim 4 săptămâni).

Etiologia meningitelor

Cele mai frecvente bacterii implicate in determinarea meningitei acute sunt: *Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae,*

Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus, bacili gram negativi. Meningita acută corelată cu şunt LCR este determinată de: stafilococi coagulazo-negativi, *S.aureus, Enterobacteriaceae* si BGN nonfermentativi. În etiologia meningitei cronice (pleiocitoza cu Lf) sunt implicate următoarele bacterii: *Nocardia asteroides, Brucella* spp*, Leptospira interrogans, Mycobacterium tuberculosis, Treponema pallidum.* Meningitele fungice (*Cryptococcus neoformans, Candida albicans*) sunt rare si apar la gazda imunocompromisă. Meningitele virale sunt relativ frecvente si evoluează de obicei benign, chiar dacă nu beneficiază de tratament antiviral.

4.1.2. Alte lichide de punctie

a. Lichidul pleural

În mod normal, lichidul pleural conţine câteva celule şi are o consistentă similară cu a serului, dar cu un conţinut redus de proteine. Când creşte cantitatea de lichid apare transudatul, ca rezultat al unei afecţiuni cardiace, renale sau hepatice. Exsudatul pleural conţine numeroase leucocite şi alte semne de inflamaţie şi apare în infecţii, afecţiuni maligne, infarct pulmonar sau boala autoimună. Empiemul este un exsudat ce conţine numeroase PMN si este purulent macroscopic, fiind determinat de pneumonii sau infecţii subdiafragmatice.

b. Lichidul peritoneal

Reprezintă o cantitate mică de lichid ce există în cavitatea peritoneală şi în mod normal are un conţinut redus de proteine şi rare leucocite. Ca urmare a unui proces inflamator sau infecţios,creşte cantitatea de lichid peritoneal, provocând ascita.

În peritonita primară nu există un focar de infecţie evident; este determinată la copii de pneumococi, streptococi de grup A, enterobacteriacee, stafilococi, la adulţi de *Escherichia coli*, pneumococi, iar la femei active sexual poate fi determinată de: *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis.* Peritonita secundară apare dupa perforaţia unui viscer, posttraumatic sau postoperator, având ca etiologie o asociere de bacterii anaerobe, enterobacteriacee, enterococi sau alţi streptococi.

c. Lichidul pericardic

Spatiul dintre epicard si pericard contine in mod normal 15-20 ml lichid clar.

Etiologia pericarditei este determinată de: virusuri (enterovirusuri, adenovirusuri), rar bacterii (*Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Enterobacteriaceae)*, fungi (*Aspergillus* spp, *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*) sau paraziţi (*Entamoeba histolytica, Toxoplasma gondii*).

d. Lichidul articular

Artrita infecţioasă poate afecta orice articulaţie a organismului, având ca agenţi etiologici: *Staphylococcus aureus, Neisseria gonorrhoeae* (la tineri sub 30 ani), *Haemophilus influenzae* (copii sub 2 ani), streptococi grup A si B, pneumococi

4.2. Abrevieri

AS: mediu agar cu 5 % sânge;
Ach: agar chocolat;
BCC: bulion cord creier;
Ecn: elemente celulare nucleate;
LCR: lichid cefalorahidian;
LPl: lichid pleural;
LA: lichid de ascită;
LPe: lichid pericardic;
LS: lichid sinovial (articular).
PMN: polimorfonucleare neutrofile
H: hematii
L: leucocite

5. DESCRIEREA PROCEDURII

5.1. Conditii prealabile

Operatorul care efectuează analiza va purta echipament de protecţie si va respecta normele de protecţia muncii si de lucru specifice laboratorului.

Pregătirea materialelor de laborator

Mediile de cultură,coloranţii se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri şi recipiente şi apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice , conform IL- , Ed.1, Rev0/.....

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticluţe, flacoane) este pregatită pentru utilizare de către asistentul de laborator conform IL- , Ed.1, Rev0/.....

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură şi sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2- 3 zile şi se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură şi în cutii cu capac eprubetele, sticluţele şi lamele.

5.2. Resurse necesare

Echipamente

-hota cu flux laminar seria
-termostat
-frigider;
-lampa UV
-microscop optic

Resurse

-anse;
-lame microscop;
-camera de numărat Fuchs-Rosenthal;
-ulei de cedru;
-bec de gaz Bunsen;

-baie colorare;
-cutii Petri;
-tampoane exsudat;
-densimat/scala nefelometrica Mc Farland;
-pense;
-pipete automate;
-pipete sterile;
-varfuri albastre si galbene pentru pipete automate;
-cristalizor/recipiente pentru solutii dezinfectante;
-lame/lamele;
-eprubete sterile de 10/10;
-stative eprubete;
-containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

Reactivi

-medii de cultură: agar cu 5% sânge de berbec, agar chocolat, agar Mac Conkey, agar Sabouraud;
-materiale de control, tulpini de referinţă;
-discuri pentru antibiogramă;
-trusa de latexaglutinare pentru diagnosticul meningitelor;
-trusa de coloratie Gram, albastru de metilen şi May-Grunwald-Giemsa;
-ser fiziologic;
-soluţii dezinfectante;
-tulpini de referinţă.

Mediile de cultură sunt preparate în laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind însoţit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerinţele specificate (grosime turnat in placă, pH-ul mediului, sterilitatea,etc).

5.3. Continutul procedurii

Principiul biologic care stă la baza examinării LCR/ lichidelor de puncţie constă în recoltarea şi cultivarea produsului patologic, izolarea, identificarea agentului patogen şi determinarea sensibilităţii la antibiotice.

5.3.1. Recoltarea

Lichidul cefalorahidian se recoltează de către clinician la patul bolnavului, în volum de 5-10 ml, repartizat in 2-3 eprubete sterile. Tuburile recoltate se etichetează la patul bolnavului şi sunt trimise la laborator împreună cu cererea de analiză, ce trebuie sa cuprindă: nume si prenume, vârsta, diagnostic şi dacă pacientul este sub tratament cu antibiotice.

Celelalte lichide de puncţie se recoltează prin puncţie cu seringa in condiţii de asepsie, fiind necesari 10-15 ml în cazul lichidelor pleurale si peritoneale si 4-5 ml pentru cele articulare.

5.3.2. Transportul

Proba se transportă imediat si fără refrigerare la laborator. Temporizarea examinării distruge celulele (leucocitele polimorfonucleare scad cu ~50% la 1 oră după prelevare), iar refrigerarea omoară meningococii.

În afara programului normal de lucru proba de LCR, lichid de puncţie se păstreaza in termostatul de gardă.

5.3.3. Procesarea produsului biologic

Medicul care deserveşte compartimentul de microbiologie 1 preia eprubetele cu LCR/lichid de puncţie şi formularele de solicitare analize, apoi le înregistrează în registrul de lucru, notând date de identificare pacient, analiza şi numele operatorului.

Când cantitatea de LCR primită în laborator apare insuficientă, prioritatea investigaţiilor trebuie stabilită de comun acord cu medicul care a solicitat examinarea.

Etapele examenului microbiologic sunt:

5.3.3.1. Examenul macroscopic

Se apreciază:

- Transparenţa: clar/ opalescent/ tulbure/ purulent. Se examinează proba, comparativ cu apa de robinet, în tuburi identice aplicate pe un text tipărit cu litere negre. Probele care au sub 150 celule/mmc sunt clare. Opalescenţa poate fi sesizată daca lichidul conţine >200 polimorfonucleare sau 400 limfocite sau 800 hematii/mmc. Lichidul devine tulbure dacă are peste 1000 celule/mmc, iar la peste 10.000 celule/mmc are aspect purulent.
- Culoarea: incolor/ roşu opalescent/ roşu transparent (lacat)/ xantocrom; citirea este repetată şi după centrifugarea probei, cu aprecierea culorii supernatantului si sedimentului. LCR este roşu opalescent în hemoragii meningiene, defect de puncţie sau meningite cu lichid hemoragic (cărbunoasa sau leptospirotică). Aspectul lacat si xantocrom apar în hemoragii meningiene mai vechi.
- Fluiditatea.LCR normal e fluid ca apa. Probele purulente sunt vâscoase; unele pot coagula sau prezintă numai văl de fibrină. Vălul fibrinos apare in meningita tuberculoasă, rar in cea virală sau neoplazică. Trebuie evitată coagularea lichidelor de puncţie, prin adăugarea unei cantităţi mici de heparină.

5.3.3.2. Examenul microscopic

a. Examenul citologic cantitativ (numărarea elementelor din lichidul de puncţie)

Se execută în cazul probelor de lichid cu aspect clar, opalescent, tulbure sau hemoragic; se pot exclude probele purulente.

Numărătoarea elementelor din lichidul de puncţie se face pe o cameră de numărat Fuchs Rosenthal:

- după agitarea probei se aspiră o cantitate mică de lichid cu o pipetă sterilă şi se depune o picatură pe cameră la marginea lamelei pe coloana centrală. Lichidul difuzează prin capilaritate si acoperă reţeaua.
- se lasă să sedimenteze câteva minute, apoi se examinează la microscop;
- se numără la microscop cu obiectivul 20.

- când reacţia inflamatorie e mică/ moderată, se numără elementele inflamatorii de pe suprafaţa întregii reţele, rezultatul se împarte la 3 şi se obţine numărul de elemente pe mmc. Se numără numai elementele inflamatorii, niciodată hematiile. Când există hematii la examenul microscopic, se semnalează prezenţa acestora.
- când reacţia inflamatorie e mai importantă, se numără elementele de pe 4 pătrate mari, rezultatul se inmulţeşte cu 4 şi se împarte la 3, obţinându-se numărul de elemente pe mmc;
- în cazul lichidelor hematice, e foloseşte o picătura de acid acetic glacial; acesta lizează hematiile şi lasă numai leucocitele, care se numără.

Corecţia pentru leucocite (sânge prezent in probă):

L/mmc LCR= L/mmc sânge x H/mmc LCR / H/mmc sânge

b. Examenul citologic calitativ (determinarea tipului de celule din sediment)

- Se efectuează un frotiu din o picătură de lichid, fără etalare, depusă pe o lamă nouă de microscop sau după centrifugarea lichidului.
- o eprubetă cu lichidul de puncţie se centrifughează 10 minute la 3000 turaţii/minut;
- se decantează supernatantul la flacără in altă eprubetă;
- se omogenizeaza sedimentul în cele câteva picături (0,5-1ml sediment) ce se scurg din eprubetă;
- din sediment se efectuează 3 frotiuri pe lame curate (de preferat noi) si culturi (din probele purulente frotiul se efectuează direct, fără centrifugare);
- frotiurile se usucă la temperatura camerei, apoi se fixează şi se colorează unul cu albastru de metilen/May-Grunwald-Giemsa, unul gram, iar unul este de rezervă.
- primul frotiu se colorează cu albastru de metilen 3-5 minute, apoi se spală, se usucă şi se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie. Se numără diferenţiat polimofonuclearele neutrofile (PMN), limfocitele (Lf) si macrofagele (Mf) pentru a stabili formula procentuală a reacţiei inflamatorii. Se notează aspectul celulelor: PMN nealterate indică un proces septic acut sau o infecţie tuberculoasă la debut, Lf apar în infecţii cronice sau de vecinătate, iar eozinofilele exprimă o reacţie alergică sau parazitară; rare celule epiteliale se evidenţiază în transudate. La nou-născuţi şi sugari, diagnosticul de meningita bacteriana acuta este acceptat in prezenţa a >8 celule nucleate/mmc sau a cel puţin 1 PMN/mmc.

c. Bacterioscopia

- al doilea frotiu se colorează gram si evidenţiază caracterele morftinctoriale ale microorganismelor, frecvenţa şi localizarea.
- în suspiciunea de meningită tuberculoasă, se efectuează un frotiu în straturi suprapuse şi se colorează Ziehl-Neelsen;
- se poate efectua si preparat lama-lamelă pentru depistarea şi identificarea microscopică a criptococilor, amibelor şi leptospirelor din LCR.

Bacterioscopia pe frotiurile colorate cu albastru de metilen este frecvent mai sensibilă decât cea pe frotiuri colorate gram.

Aspectul frotiurilor pentru microorganismele mai frecvent întâlnite in etiologia meningitelor:

– *Neisseria meningitidis* apare sub formă de diplococi gram negativi, cu marginile adiacente aplatizate (dispuşi în boabe de cafea), extra- si intracelulari. Evidenţierea lor

pe frotiurile colorate gram este uneori mai dificilă din cauza coloraţiei asemănătoare cu a detrisurilor celulare.

- *Streptococcus pneumoniae* se colorează gram pozitiv, având forma de diplococi lanceolaţi, frecvent capsulaţi.
- *Haemophilus influenzae : c*ocobacili sau bacili scurţi, drepţi, rar incurbaţi, uneori polimorfi, cu sau fără filamente, gram negativi.
- Alţi bacili gram negativi: majoritatea sunt enterobacterii, care nu prezintă nimic tipic din punct de vedere morfologic. Bacteriile din grupul Acinetobacter sunt morfologic foarte asemănători cu *Neisseria meningitidis*.
- *Listeria monocytogenes* apare în frotiul direct din LCR sub formă de cocobacili gram pozitivi izolaţi, în perechi sau în lanţuri scurte.
- *Cryptococcus neoformans*: levuri rotunde sau ovale, inmugurite, gram pozitive şi înconjurate de un halou mare incolor.

5.3.3.3. Depistarea antigenică

Sunt disponibile teste rapide pentru depistarea antigenelor bacteriene (*Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* tip b, streptococi de grup B, *Escherichia coli*) în supernatantul LCR sau în lichidul ca atare.

Testul de latexaglutinare detectează in ~20 minute antigene bacteriene in cantităţi de ng/ml. Tehnica de lucru este conform prospectului din trusă. Reacţia se efectuează pe probe de LCR incălzite 5 minute în baie de apă la fierbere; proba încălzită se centrifughează 10 minute la 3000 turaţii/ minut, iar supernatantul este folosit pentru reacţia de latexaglutinare cu antigen de meningococ grup A, B, C, pneumococ, *Haemophilus influenzae* b şi *Streptococcus agalactiae*.

5.3.3..4.Cultivarea

Medii de cultură folosite:

- AS- agar Columbia sau agar nutritiv cu 5% sânge de berbec;
- Ach- agar chocolat;
- BCC- bulion cord-creier;
- Mediul Sabouraud
- este un mijloc de diagnostic specific, dar necesită 24-48 ore si poate fi negativă in cazul prezenţei germenilor neviabili, etiologiei virale sau dacă pacientul este pretratat cu antibiotice.
- se însămânţeaza 1-2 picături din sedimentul LCR/ alte lichide sau direct din lichidele purulente pe medii preîncălzite la termostat: câte o placă cu mediu Columbia cu 5% sânge, o placă cu agar şocolat şi un tub cu bulion cord creier si se incubează la 37ºC, în atmosfera cu 5% bioxid de carbon. Se urmăreşte zilnic apariţia culturii, timp de 2 zile pe mediile solide si 5 zile in tubul cu BCC. Însămânţarea plăcii cu agar-chocolat nu este necesară cand bacterioscopia a depistat bacterii gram pozitive.
- în funcţie de suspiciunea clinică şi de bacterioscopie, se pot adăuga şi alte medii.
- când se presupune etiologia tuberculoasă, se însămânţeaza sedimentul LCR centrifugat 30 minute la 3000 G pe un tub cu mediu Lowenstein-Jensen; se incubează tuburile aerob la 37ºC în poziţie înclinată 24 ore, apoi în poziţie verticală. După 14 zile de incubare se urmăreşte apariţia culturii săptămânal până la 8 săptămâni.

- pentru cultivarea fungilor se însămânţeaza 1-2 picături din sedimentul de lichid pe o placă cu mediu Sabouraud şi se incubează la 30º C.

Citirea culturilor

A doua zi

- Se urmăreste apariţia culturilor pe mediile solide si lichide.
- În cazul culturilor pozitive se continuă identificarea până la nivel de specie şi se efectuează antibiograma; daca se pozitivează cultura numai pe BCC, se fac frotiuri şi repicări pe medii solide AS si Ach, cu incubare 24 ore la 37 grade. În cazul în care se constată lipsa creşterii pe toate mediile, acestea se reincubează şi se examinează zilnic timp de 5 zile.
- În suspiciunea unei infecţii cu anaerobi, recoltarea se face în recipiente speciale ce menţin condiţiile de anaerobioză.

5.3.3.5. Identificarea izolatelor se face prin:

-Examen microscopic;
-Caractere de cultură;
-Caractere biochimice;
-Caractere antigenice.

Pentru identificare se efectuează frotiu din cultură si se pot utiliza următoarele teste: catalaza, oxidaza (pozitivă la meningococi şi *Pseudomonas aeruginosa)*, latexaglutinare din cultură, testul de sensibilitate la Optochin (pozitiv pentru pneumococi), testul coagulazei (pentru stafilococi), test de filamentare pentru levuri. Se poate face identificare automată pe galerie API.

Neisseria meningitidis

-Examen microscopic: diplococi gram negativi, cu diametrul de 0,6-1 mm, feţele adiacente reniforme sau aplatizate (în boabe de cafea);
-Caractere de cultură: pe AS sau Ach, dupa 24-48 ore incubare in atmosferă de CO2 la 37 grade, formează colonii S transparente, de 1-2 mm diametru;
-Caractere biochimice: testul oxidazei pozitiv;
-Latexaglutinarea poate identifica meningococii de grup A, B, C, Y, W135.

Streptococcus pneumoniae

-Examen microscopic: coci gram pozitivi, lanceolaţi, frecvent capsulaţi, dispuşi în diplo şi în scurte lanţuri;
-Caractere de cultură: pe AS formează colonii gri-opace, alfa-hemolitice, cu diametrul de ~1 mm, care pot autoliza în câteva ore, devenind crateriforme. Tulpinile capsulate formează colonii transparente mucoide. Pe mediile lichide pneumococii cresc, tulburând omogen mediul.
-Testul de sensibilitate la optochin diferenţiază prezumtiv streptococii alfa-hemolitici în pneumococi, sensibili (diametrul zonei de inhibiţie>14 mm) şi streptococi viridans, rezistenţi.

Haemophilus influenzae

-Examen microscopic: cocobacili gram negativi polimorfi;

-Caractere de cultură: pe Ach, în atmosfera cu CO2, formează colonii gri-lucioase sau semiopace, netede, plane sau convexe, cu margini precise şi diametrul de 1-2 mm, rotunde, convexe, transparente sau albastru-verzui.

Enterobacteriaceae

-Examen microscopic: bacili gram negativi

-Caractere de cultură: Fiind nepretenţioase nutritiv, cultivă pe toate mediile de cultură utilizate. Pe AS formează colonii „S" de 2-3 mm, bombate, rotunde, umede, cu suprafaţa netedă şi margini regulate sau colonii „R", rotunde, plate, cu suprafaţa rugoasă şi margini neregulate. Unele tulpini dezvoltă hemoliză. Pe mediile lichide formele „S" tulbură uniform mediul, iar formele"R" tulbură mediul în grade diferite, cu inel si depozit.

-Caractere biochimice: Se folosesc sistemele multitest: TSI (fermentarea lactozei, glucozei si producerea de hidrogen sulfurat), manita (fermentarea manitei, mobilitate si producere de ureaza), se testează producerea de indol, lizin decarboxilaza, citrat dehidrogenaza si fenilalanildezaminaza. Se poate face si identificarea automata pe galerii API.

Staphylococcus aureus

-Examen microscopic: stafilococii apar sub formă de coci rotunzi, dispuşi in grămezi neregulate, asemănătoare ciorchinelor de strugure.

-Caractere de cultură: Obişnuit, coloniile de *S. aureus,* dupa incubare 18 ore la 37 ^{0}C pe mediu solid au aspect S, sunt cremoase, rotunde, cu diametrul de 2-3 mm, margini perfect regulate, suprafaţa netedă, bombată si lucioasă. Pe AS cu 5% sange de berbec coloniile au o zona circulară de hemoliză în jur. Prezenţa pigmentului carotenoid, portocaliu sau galben citrin, este o caracteristica a tulpinilor de *S. aureus*, dar si a unor stafilococi coagulazo-negativi (*S. saprophyticus, S. hominis)*. Pigmentogeneza necesită prezenţa oxigenului şi este mai intensă la 20 grade C decât la 37. Nu toate tulpinile de *S. aureus* produc hemolizină sau pigment.

-Testul catalazei: Stafilococii dau testul catalazei pozitiv; prin suspensionarea culturii de stafilococ într-o picatură din soluţia 20% de peroxid de hidrogen pe o lamă de sticlă, apar bule de gaz.

-Testul coagulazei: Identificarea rapidă a speciei se face cu ajutorul reactivilor comerciali de aglutinare. Reactivii sensibilizaţi cu fibrinogen si IgG cuplează coagulaza legată respectiv proteina A din peretele *S. aureus*, ducând la aglutinarea amestecului dintre reactiv şi cultura de *S. aureus*.

Listeria monocytogenes

-Examen microscopic: cocobacili sau bacili gram pozitivi, nesporulaţi; in culturile vechi predomină formele bacilare lungi si filamentoase.

-Caractere de cultură: Pe geloză sânge coloniile sunt de dimensiuni mici, 1-1,5 mm şi apar adeseori înconjurate de beta hemoliză. Cultivă la temperaturi intre 0 si 45 grade, optim la 20 – 37.

Candida albicans

-Examen microscopic: celule ovale, gram pozitive, unele înmugurite

-Caractere de cultură: pe mediul Sabouraud formează colonii mari, de 2-5 mm diametru, cremoase, albe sau crem, care degajă o aromă de drojdie.

-Testul de filamentare: Se suspensionează câteva colonii de levuri într-o eprubetă ce conţine 0,5 ml ser sanguin. Se agită, se lasă la termostat 2-3 ore, se efectuează un preparat lama-lamelă din suspensia obţinută şi se urmăreşte la microscop apariţia filamentelor. *Candida albicans* dă testul de filamentare pozitiv.

Cryptococcus neoformans

-Examen microscopic: celule sferice, cu dimensiuni variabile de la 2 la 15 microni, izolate sau înmugurite, de obicei capsulate.

-Caractere de cultură: Pe mediul Sabouraud formează după incubare 24-48 ore la 37 grade colonii albe, cremoase.

-Testul ureazei pozitiv.

-Identificarea definitivă se realizează folosind o galerie de identificare API Candida sau ID 32 C.

2.2.4.5.Antibiograma

Antibiograma se poate efectua pe cultură primară dacă la microscopia directă se evidenţiază o densitate bacteriană suficientă (zeci de bacterii pe câmp microscopic la examinarea cu imersie x 1000). Rezultatele vor fi confirmate prin antibiograma pe subcultura standardizată. Este de preferat testarea cantitativă celei difuzimetrice. Se efectuează E test la penicilină si cefotaximă pentru meningococii, pneumococii şi streptococii izolaţi din LCR.

5.4. Prezentarea rezultatelor

Interpretare rezultate

Pentru identificarea microorganismului patogen se face corelarea caracterelor microscopice, de cultură, biochimice si antigenice.

Comunicarea rezultatelor

Tratamentul antimicrobian al meningitelor reprezintă o urgenţă şi este iniţiat pe baza raţionamentului clinico-epidemiologic. Comunicarea etapizată a rezultatelor poate orienta mai ţintit acest tratament. De aceea, se comunică telefonic imediat ce se obţin rezultatele examenului macroscopic, citologic, bacterioscopic şi al reacţiei de latexaglutinare, urmând a fi completat buletinul de analiză al etapei.

Examenul macroscopic

Se noteaza:-transparenţa (lichid clar/ opalescent/ tulbure/ purulent);
-culoarea (incolor, hemoragic, lacat sau xantocrom);
-fluiditatea (fluid, vâscos sau cu văl de fibrină).

Examenul microscopic

a. Examenul citologic cantitativ

Citologia cantitativă este esenţială pentru probele de LCR clare, opalescente sau tulburi.Se poate renunţa la ea în cazul probelor purulente.

Se comunică numărul de elemente celulare nucleate/mmc (de ex:750 ecn/mmc).

Dacă sunt mai puţin de 3 ecn/ mmc, rezultatul se va comunica astfel: "absenţa reacţiei inflamatorii".

Un lichid normal contine 0-5 ecn/mmc, de obicei limfocite. Numărul leucocitelor creşte variabil în funcţie de natura şi stadiul evolutiv al meningitei:

-50- 1000 /mmc in meningitele acute virale

-50- 500/mmc in meningita tuberculoasă

~10.000 ecn/mmc in meningitele acute bacteriene şi în abcesul cerebral.

b. Examenul citologic calitativ

Se comunică formula procentuală a reacţiei inflamatorii, cu precizarea procentului de polimorfonucleare, limfocite, macrofage (şi celule mezoteliale în alte lichide de puncţie,ca LA).

In meningita bacteriană acută apare reacţie inflamatorie cu PMN, care virează spre o reacţie cu limfocite pe măsură ce procesul infecţios dispare. Meningitele virale sunt caracterizate de o reacţie inflamatorie de tip limfocitar (în faza precoce poate exista reacţie cu PMN). In meningita tuberculoasa reactia celulara este cu predominanta limfocitelor, dar există şi un procent redus de PMN. În meningita leptospirotică, proporţia de PMN si limfocite este variabilă.

c. Bacterioscopia

Anunţarea rezultatelor bacterioscopiei directe are un caracter de urgenţă şi va face referiri la morfologia microorganismelor (coci, bacili, cocobacili, filamente, prezenţa de capsulă, spori), caracterul gram, acidoalcoolorezistenţa, frecvenţa (foarte rari, rari, frecvenţi, numeroşi) şi raportul acestora cu elementele celulare (extra-sau intracelulari).

Bacterioscopia pe frotiuri colorate cu albastru de metilen este mai sensibilă decât cea pe frotiuri colorate gram. Sensibilitatea depistării BAAR creşte pe frotiuri efectuate în straturi suprapuse.

Reacţia de latexaglutinare

Se comunică rezultatul în urgenţă, precizând dacă este negativă sau pozitivă cu: *Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis* grup A,B,C,Y sau W 135, *Streptococcus agalactiae* sau *Haemophilus influenzae* tip b.

Este foarte importantă pentru pacienţii cu meningite bacteriene pretrataţi cu antibiotice, la care rezultatul bacterioscopiei directe este negativ.

Cultura

Culturile bacteriene se dezvoltă de obicei în 24- 48 ore şi rezultatul se comunică imediat ce se identifică tulpina bacteriană, precizându-se specia identificată (e.g.:"Prezent *Streptococcus pneumoniae"*). Micobacteriile cresc mai lent, dupa 2-3 săptămâni de incubare, rezultatul comunicându-se în momentul în care se obţine cultura pozitivă („prezent *Mycobacterium* spp").

Fungii se dezvoltă dupa 48 ore, culturile fiind urmărite 4 săptămâni. Se comunică rezultatul, precizându-se specia identificată (e.g.:"Prezent *Cryptococcus neoformans*"sau „Prezent *Candida* spp").

Daca nu s-au izolat microorganisme după incubarea timp de 48 ore a mediilor solide sau timp de 5 zile a mediilor lichide, se comunicţ absenta microorganismelor ce pot fi izolate în LCR/alte lichide de punctie.

Antibiograma (antifungigrama)

Pentru ca diagnosticul şi tratamentul meningitelor reprezintă o urgenţă, în meningitele bacteriene cu densitate bacteriană suficientă în proba de LCR (zeci de bacterii in medie pe câmp microscopic la examinarea cu imersie) se poate încerca antibiograma pe cultura primară ale cărei rezultate (comunicate la 24 ore) urmează a fi confirmate prin antibiograma pe subcultura stanadardizată. Pentru meningococii, streptococii şi pneumococii izolaţi din LCR se va face şi determinarea concentraţiei minime inhibitorii pentru penicilină şi cefotaximă.

În meningitele fungice se face antifungigrama pe galerii API (Fungus 3), rezultatul comunicându-se la 24-48 ore după izolarea şi identificarea fungului.

5.5. Activitati finale

Validarea

Validarea tehnică a analizelor este realizată de catre operator.

Validarea bioanalitică a rezultatelor este realizată de catre şeful de laborator.

Raportarea

Comunicarea rezultatelor se face:

-în scris prin buletinul de analiză care este trimis medicului curant ; buletinul de analiză este semnat si parafat de catre responsabilul de analiză şi managerul tehnic.

-în baza de date a laboratorului şi spitalului;

-rezultatele urgenţelor se transmit telefonic medicului curant.

6. RESPONSABILITĂŢI

6.1. Managerul tehnic:

Verifică şi aprobă prin semnătură şi parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01

Oferă consultanţă beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită.

Execută analizele pentru care este responsabil şi validează rezultatul acestora prin semnătură şi parafă.

6.2. Responsabilul de analiză

Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize de uz intern,cod F-PGL-5.4.-1A

Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deserveşte compartimentul 01, din registrul de lucru RGL-4.4.-03 A şi din registrul de comenzi interne şi respinse.

Examinează preparatele de microscopie optică şi culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, execută repicările, aglutinările pe lamă şi latex aglutinările, interpretează caracterele exoenzimatice dezvoltate de bacterii şi a aglutinărilor pe lamă, respectiv a latex aglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de

laborator şi formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru, cod RGL-4.4-01-A. Întocmeşte şi tipăreşte buletinul de analiză, cod F-PGL-5.8-01.

Verifică, semnează şi parafează buletinul de analiză, cod F-PGL-5.8-01 şi îl prezintă managerului tehnic spre aprobare.

6.3. Asistentul de laborator

Preia eprubetele cu lichide de puncţie concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de receptură şi de la asistentul medical de la cabinetul de recoltare.

Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registru de lucru, cod RGL-4.4.-01-A. Transportă mediile de cultură şi sticlăria pregatită pentru utilizare, în compartimentul de lucru şi pregăteşte mediile de cultură pentru însămânţare.

Efectuează însămânţarea produselor biologice pe medii de cultură, pregăteşte preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic.

Transmite buletinul de analiză, cod analiza F-PGL-5.8-01 registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltă.

7. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02
- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 A
- Buletinul de analiză F-PGL-5.8-01

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 A

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICĂ

HEMOCULTURA

COD PSL - M1 - 02

Editia 1, Revizia 0
Din data 01.05.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

Elaborat:
Conf. Univ. Dr. Olivia Dorneanu

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1. SCOPUL ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

2. DOMENIUL DE APLICARE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

4. DEFINITII SI ABREVIERI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

4.1. DEFINITII ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

4.2. ABREVIERI **6**

5. DESCRIEREA ACTIVITATII ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5.1. CONDIŢII PREALABILE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5.2. RESURSE NECESARE **6**

5.3. EXECUTIA ANALIZEI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5.5.ACIVITATI FINALE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

6. RESPONSABILITATI **9**

7. INREGISTRARI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

8. ANEXE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

1.SCOP

Prezenta procedura descrie o metoda calitativa pentru detectarea microorganismelor prezente in sânge.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Prezenta procedură este utilizată în cadrul Laboratorului de analize medicale al Spitalul Clinic de Boli Infecţioase “Sf.Parascheva” Iaşi, compartimentul de Microbiologie 1.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

3.1. MANUALUL CALITATII , Cod: MCL - 01
3.2. SR EN ISO 15189 :2007 - Cerinte particulare pentru calitate si competenta
3.3 SR ISO /TR 22869:2005 – Ghid pentru implementarea in laboratoare ISO 15189:2003
3.5. SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
3.6. SR EN ISO 9001 :2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
3.7. Dumitru Buiuc, Marian Neguţ. Tratat de Microbiologie Clinică. Ed. Medicală, Bucureşti, 2008.

4. DEFINITII SI ABREVIERI

4.1. Definitii

Hemocultura este însămânţarea şi incubarea într-un mediu de cultură adecvat a unei probe de sânge, în scopul izolării şi identificării bacteriilor sau fungilor pe care îi conţine. Sangele omului este normal steril iar sistemul circulator are importante capacitati de eliminare a microorganismelor.

Bacteriemia este prezenta in sange a bacteriilor provenite dintr-un focar septic sau de pe o mucoasa lezata. Frecvent este lipsita de expresie clinica.

Septicemia este o bacteriemie importanta cu evolutie clinica neregulata, imprevizibila si grava, acompaniata de frisoane, febra neregulata, toxemie, hipotensiune, prostratie, eruptii cutanate polimorfe si variate metastaze septice tisulare sau viscerale.Gravitatea sindromului septicemic lasa pe al doilea plan simptomatologia focarului infectios primar, care trebuie insa totdeauna cautat.

Microrganismele izolate cu semnificatie clinica izolate din hemoculturi, in ordinea frecventei sunt: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp, *Proteus* spp, streptococi alfa si beta hemolitici, pneumococi, enterococi, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, anaerobi, *Salmonella* spp, stafilococi coagulazo-negativi, *Corynebacterium* spp., *Listeria monocitogenes*, *Leptospira*, *Brucella* spp, fungi.

4.2. Abrevieri

ATCC: American Type Culture Colection
UFC: unităţi formatoare de colonii
TSI: Triple Sugar Iron (glucoză, zaharoză, lactoză, sare de fier)
MIU: mobilitate, indol, urează
SF: ser fiziologic
AD: apă distilată
BGN : bacili gram-negativi

5. DESCRIEREA ACTIVITATII

5.1. Condiţii prealabile

Anterior prelucrării hemoculturii, se efectuează instruiri ale personalului, de protectie a muncii şi securitate specifică analizei procedurale. Asistenta de la compartimentul Microbiologie 1 va purta achipament de protecţie corespunzător şi va prelucra hemocultura utilizând hota cu flux laminar din dotarea compartimentului.

5.2. Resurse necesare

5.2.1. Aparatură

- hotă cu flux de aer laminar (Lamil Plus 13)
- autoclav
- etuvă
- termostat (LEEC)
- frigider
- microscop (Optika B-350)
- lampă cu radiaţii ultraviolete
- bec de gaz Bunsen

5.2.2. Materiale şi reactivi

- baloane/flacoane cu mediu bulion cord-creier turnat în laborator
- flacoane pentru hemocultură gata de utilizare
- cutii Petri cu medii turnate în laborator (agar-sânge, agar-chocolat, agar Sabouraud)
- medii de identificare turnate în tuburi (TSI, mediu cu manită şi uree, Simmons, apă peptonată, mediu cu fenilalanină, mediu cu lizină, mediu cu bilă-esculină)

- reactiv pentru testul oxidazei
- apă oxigenată
- discuri de optochin, bacitracina
- galerii de identificare stafilococi, bacili gram-negativi, levuri
- hârtie pH
- lame de microscop
- baterie de coloraţie Gram
- soluţie dezinfectantă
- pipete
- anse de însămânţare
- scală nefelometrică McFarland
- microcomprimate pentru antibiogramă
- ser fiziologic
- tulpini de referinţă ATCC
- hârtie de filtru
- apă distilată
- pense
- eprubete
- ulei de cedru

5.3. Execuţia analizei.

Recoltare şi transport. Hemoculturile, recoltate la patul bolnavului conform Manualului de recoltare PGL-5.4-1, sunt transportate imediat la laborator, în condiţii izoterme (minim 30°C), unde sunt imediat înregistrate.

În intervalul orar în care laboratorul de microbiologie nu are activitate, hemoculturile etichetate corespunzător sunt incubate în termostatul de gardă al laboratorului.

Etichetare. Probele ajunse in laborator sunt preluate din camera de receptie de catre asistenta de compartiment. Probele sunt verificate din punct de vedere al calitatii si a datelor de identificare si sunt inregistrate in registrul de comenzi interne si primesc un numar curent de registru regasit pe culturi.

Incubare. În laborator hemoculturile sunt incubate la 37°C, incubat aerob şi/sau anaerob. Incubarea în atmosferă de 5-10% CO_2 este obligatorie pentru izolarea brucelelor. Hemoculturile sunt urmărite 7 zile, cu examinare macroscopică, microscopică şi prin subcultivare. La pacienţii cu endocardită infecţioasă, la cei aflaţi sub antibioticoterapie, pentru microroganismele cu exigenţe particulare, prelungim perioada de incubare la 14 zile.

Examenul macroscopic se face de 2 ori pe zi în primele 3 zile şi apoi zilnic, cu aprecierea semnelor creşterii:

- pe stratul de hematii examinat în lumină reflectată, prezenţa coloniilor sau a unui depozit floconos;

- tulburare uniformă sau numai la suprafaţa mediului, peliculă uneori la examinarea supernatantului prin transparenţă;
- hemoliza;
- coagularea mediului;
- prezenţa bulelor de gaz.

Microscopia. Efectuăm şi colorăm Gram frotiuri din flacoanele de hemocultură, prin manipularea strict aseptică a acestora. Examinăm frotiurile la microscopul cu imersie şi comunicăm imediat clinicianului eventualele rezultate de etapă pozitive.

Subcultivarea. Dacă hemocultura este *fără creştere evidentă*: epuizăm zilnic câte o ansă pe o placă cu agar-chocolat ce va fi incubată în aerobioză şi agar-sânge pentru anaerobi. Dacă hemocultura rămâne negativă până la sfârşitul perioadei de observaţie, din hemocultura agitată însămânţăm câteva picături într-un tub cu bulion tioglicolat pe care îl urmărim 3 zile la 37°C.

Dacă hemocultura este *cu creştere evidentă*, funcţie de flaconul în care este prezentă creşterea, etalăm câte o ansă pe mediile de cultură precizate mai sus. Efectuăm frotiu colorat Gram. Bacterioscopia precizează:

- oportunitatea testelor de identificare în cultură primară (e.g., pentru diplococi sau streptococi: sensibilitate ala optochin, bacitracină; pentru stafilococi diferenţierea *Staphylococcus aureus* de stafilococii coagulazo-negativi; bacili gram-negativi: oxidaza, triajul biochimic pe mediile TSI, MIU, citrat Simmons);
- efectuarea antibiogramei directe, nestrandardizate, utilizând drept inocul hemocultura. Aceste rezultate sunt ulterior confirmate prin antibiograma din subcultură standardizată.

Identificarea si antibiograma.
Pentru izolatele cu semnificaţie clinică se continuă investigaţia prin identificare (vezi Identificarea bacteriilor) şi prin testarea sensibilităţii la antibiotice (vezi Antibiograma difuzimetrică).

Controlul intern de calitate. Se efectueaza controlul intern de calitate al mediilor turnate, al antibiogramei difuzimetrice, al metodelor de identificare .

5.4. Prezentarea rezultatelor.
Rezultatul de etapă poate fi precizat după examenul frotiului din hemocultura pozitivă colorat Gram. Se precizează categoria microscopică a bacteriei observate şi numărul de hemoculturi în care este ea prezentă la un anume pacient.
Rezultatul final se comunică după identificarea bacteriei izolate şi testarea sensibilităţii ei la antibiotice. Interpretarea semnificaţiei clinice a bacteriei izolate este făcută de către clinician având în vedere argumentele microbiologului (număr de hemoculturi pozitive, număr de flacoane pozitive etc) şi argumentele clinicianului.

Rezultat pozitiv : Prezent, urmează numele speciei identificate.

Rezultat negativ : Absenţi după 7 zile de incubare : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp, *Proteus* spp, streptococi alfa si beta hemolitici, pneumococi, enterococi, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, anaerobi, *Salmonella* spp, stafilococi coagulazo-negativi, *Corynebacterium* spp., *Listeria monocitogenes*, fungi

5.5. Activităţi finale.

După prelucrarea hemoculturii, se închide hota, se decontaminează suprafeţele de lucru, se pune în funcţiune lampa cu ultraviolete. Hemocultura se reincubează în termostat, la 37°C.

După prelucrarea subculturilor se închid şi depozitează în frigider kiturile de latex aglutinare utilizate, microcomprimatele cu substanţe antimicrobiene.

După examinarea frotiurilor se închide microscopul şi se efectuează mentenanţa la sfârşitul zilei lucrătoare.

6. RESPONSABILITATI

Medicul responsabil de analiză:

- citeste si interpreteaza rezultatele
- efectueaza controlul intern si extern de calitate
- valideaza rezultatul prin semnatura şi parafă

Asistentul de laborator:

- Inregistreaza proba in registrul de evidenta a analizei
- Verifica functionarea mijloacelor de incercare si / sau masurare
- Pregateste probele pentru a fi citite de catre responsabilul de analiza conform procedurii specifice
- Comunica orice problema intervenita in timpul prelucrarii probelor
- Inregistreaza rezultatele

7. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02
- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 B
- Buletinul de analiză F-PGL-5.8-01

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 B

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICĂ

ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL

COD: PSL – M1 – 03

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

ELABORAT
Responsabil de analiză
Dr. Olga Filip

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1.SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ
4. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
5.1. CONDIŢII PREALABILE
5.2. RESURSE NECESARE
5.3. CONŢINUTUL PROCEDURII (EXECUŢIA ANALIZEI, ACTIVITĂŢI)
5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
5.5. ACTIVITĂŢI FINALE
6. RESPONSABILITĂŢI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

1. SCOPUL

Procedura descrie activităţile şi etapele privind prelucrarea exsudatului faringian şi nazal în scopul stabilirii diagnosticului etiologic în angine şi a depistării portajului faringian şi nazal de *Streptococcus pyogene*s şi *Staphylococcus aureus*.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecţioase „Sf. Parascheva" Iaşi.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- Manualul calitatii
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguţ,Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,Bucureşti, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977
- Manualul de recoltare a probelor biologice
- D. Buiuc, Microbiologie medicală- Ghid pentru studiul şi practica medicinei, Ed.Gr T Popa Iasi, 2003
- D. Buiuc, M. Neguţ, Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală, Bucureşti, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977
- Prospectele truselor de reactivi

4.DEFINITII SI ABREVIERI

4.1.Definitii

Exsudat faringian: produs biologic/patologic recoltat de la nivelul faringelui (văl palatin, amigdale, pilieri).

Exsudat nazal: produs biologic/patologic recoltat de la nivelul mucoasei nazale.

Semnificaţie clinică - exsudat faringian

Examenul microbiologic al exsudatului faringian se efectuează pentru:

- diagnosticul faringitelor şi anginelor streptococice;
- depistarea portajului de *Streptococcus pyogenes* şi *Staphylococcus aureus*;
- diagnosticul anginelor fungice.

Streptococcus pyogenes este responsabil de majoritatea anginelor bacteriene, cărora le imprimă gravitate prin complicaţii infecţioase (sinuzite, otite, mastoidite,

adenite cervicale supurate, flegmon amigdalian) sau postinfecţioase (reumatism poliarticular acut, miocardita acuta, glomerulonefrita acuta, coree). Scarlatina apare în cursul infecţiei streptococice, cel mai frecvent faringiană, rar a unei plăgi, cu tulpini eritrotoxigene la persoane care nu posedă antieritrotoxină.

Streptococii de grup C su G sau *Arcanobacterium haemolyticum* sunt ocazional cauza unor faringite.

Infecţii secundare ale orofaringelui si cavităţii bucale sunt determinate de comensali conditionat patogeni (angina si stomatita fuso-spirochetozica Vincent, candidoza) când rezistenţa antiinfecţioasă este scazută.

Semnificaţie clinică - exsudat nazal

Examenul bacteriologic al exsudatului nazal este indicat pentru depistarea portajului de *Staphylococcus aureus* (spre exemplu, in izbucniri epidemice de infecţie nosocomiala stafilococica) şi *Streptococcus pyogenes*.

4.2. Abrevieri

AS: agar Columbia cu 5% sange de berbec;
LA: latexaglutinare
MC: mediul Mac Conkey
Sab C: mediul Sabouraud cu cloramfenicol

5. DESCRIEREA PROCEDURII

5.1. Conditii prealabile

Operatorul care efectuează analiza va purta echipament de protecţie si va respecta normele de protecţia muncii si de lucru specifice laboratorului.

Pregătirea materialelor de laborator

Mediile de cultură,coloranţii se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri şi recipiente şi apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice.

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticluţe, flacoane) este pregatită pentru utilizare de către asistentul de laborator .

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură şi sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2- 3 zile şi se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură şi în cutii cu capac eprubetele, sticluţele şi lamele.

5.2. Resurse necesare

Echipamente

-hota cu flux laminar
-termostat
-frigider;
-lampa UV
-microscop optic

Resurse

-anse;
-lame microscop;
-ulei de cedru;
-bec de gaz Bunsen;
-baie colorare;
-cutii Petri;
-tampoane exsudat;
-densimat/scala nefelometrica Mc Farland;
-pense;
-pipete automate;
-pipete sterile;
-varfuri albastre si galbene pentru pipete automate;
-cristalizor/recipiente pentru solutii dezinfectante;
-lame/lamele;
-eprubete sterile de 10/10;
-stative eprubete;
-containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

Reactivi

- medii de cultură: agar Columbia cu 5% sânge de berbec, agar Columbia cu 5% sânge şi 3,5% clorura de sodiu, agar Sabouraud cu cloramfenicol, agar Mac Conkey;
- materiale de control, tulpini de referintă;
- discuri pentru antibiogramă si pentru testul la bacitracina;
- trusa de identificare grup streptococi;
- trusa de identificare *Staphylococus aureus*;
- trusa de coloratie Gram si albastru de metilen;
- ser fiziologic;
- perhidrol;
- solutii dezinfectante.

Mediile de cultură sunt preparate in laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind insoţit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerinţele specificate (grosime strat turnat in placă, pH-ul mediului, sterilitatea, etc).

5.3. Continutul procedurii

Proba este reprezentata de tamponul cu exsudatul faringian sau exsudatul nazal prelevat.

Principiul biologic care sta la baza examinării exsudatului faringian si a exsudatului nazal constă in recoltarea, cultivarea, izolarea, identificarea agentului patogen şi determinarea sensibilităţii la antibiotice. Examenul uzual al exsudatului faringian vizează depistarea si identificarea streptococilor beta-hemolitici. Cultivarea pentru alte bacterii se face numai la cerere expresă, pentru că necesită alte medii de cultura.

5.3.1. Recoltarea

Recoltarea şi transportul la laborator se efectuează conform instrucţiunilor descrise in „Manualul de recoltare a produselor biologice”.

5.3.2. Transportul

Transportul probelor la laborator se face în maxim 3 ore de la prelevare. Dacă acest interval nu poate fi respectat, se impune transportul tamponului in bulion de conservare-îmbogăţire (Todd-Hewitt cu azid de sodiu si cristal violet), astfel putând fi păstrate 24 ore.

5.3.3. Procesarea produsului biologic

Asistentul care deserveşte compartimentul de microbiologie 1 preia tampoanele cu exsudate faringiene/nazale şi formularele de solicitare analize de la registratorul medical, apoi le înregistrează în registrul de lucru, notând date de identificare pacient, analiza şi numele operatorului.

Etapele examenului microbiologic sunt:

5.3.3.1. Examenul microscopic direct al frotiului (efectuat prin descărcarea tamponului pe o lamă de microscop) colorat Gram este indicat doar în suspiciunea anginei Vincent sau a celei fungice.

Se urmăreşte:

- prezenţa în cantitate mare de levuri, în special sub formă de pseudohife în candidoza faringiană;
- prezenţa a numeroşi bacili fusiformi gram negativi şi spirochete asociaţi reacţiei inflamatorii în angina Vincent.

Rezultatul poate fi comunicat imediat.

5.3.3.2. Cultivarea

Medii de cultură folosite:

- AS - agar Columbia cu 5% sânge de berbec sau
- Mediul selectiv AS cu 3,5% clorură de sodiu (inhibă flora de asociaţie, mai ales streptococii orali, favorizand izolarea streptococilor beta hemolitici de grup A, B, C sau G).
- Mediul Sabouraud cu cloramfenicol se utilizează când este recomandată izolarea fungilor din exsudatul faringian;
- Mediul Mac Conkey este utilizat daca se solicita depistarea portajului de *Enterobacteriaceae, Pseudomonas* spp sau *Acinetobacter* spp;
- agar Muller Hinton sânge.

Tamponul se descarcă prin rulare pe un sector al unei plăci cu AS, apoi se dispersează inoculul cu ansa în celelalte trei sectoare. Prin inţepare sau scurtă secţionare a mediului cu ansa la sfarsitul epuizării in fiecare cadran se creeaza condiţii microaerofile care protejează de oxidare streptolizina O si permit depistarea tulpinilor de *Streptococcus pyogenes* neproducătoare de streptolizina S.

Se pot descărca două tampoane pe câte o jumătate de placă Petri sau chiar trei, dacă se foloseşte mediu selectiv AS cu 3,5 % clorură de sodiu.

Dacă este recomandat, tamponul se descarcă şi pe ½ placă cu agar Sabouraud cu cloramfenicol (pentru a izola *Candida* spp) si pe ½ placa cu agar Mac Conkey (pentru a izola bacili gram negativi).

Incubarea plăcilor cu AS se realizează aerob la 37^0C timp de 18-24 ore, prelungindu-se până la 48 ore la temperatura camerei dacă la prima citire lipsesc coloniile beta hemolitice caracteristice.

Placa cu mediul Sabouraud cu cloramfenicol se incubează 18-24 ore la 37^0C, apoi la temperatura camerei 7 zile.

Citirea culturilor

Se examinează plăcile cu AS în lumină transmisă şi reflectată, urmărind prezenţa şi numărul coloniilor mici (0,5-1mm diametru), transparente sau opace, înconjurate de o zonă largă de beta hemoliză, specifice streptococilor beta hemolitici şi coloniile mari, cremoase, beta hemolitice, caracteristice stafilococului auriu.

Pe plăcile cu mediu Sabouraud se urmăresc coloniile mari, cu diametrul de 2-5 mm, cremoase, albe , cu miros de drojdie.

Incubarea se prelungeşte prin păstrarea plăcilor la temperatura camerei încă 24 ore pentru streptococi şi stafilococi şi 7 zile pentru fungi.

5.3.3.3. Identificarea izolatelor se face prin:

- frotiu colorat Gram
- testul catalazei diferenţiază streptococii de stafilococi (streptococii sunt catalazo negativi)
-testul de sensibilitate la bacitracină diferenţiază streptococii beta hemolitici de grup A de cei non grup A
-identificarea antigenică a grupului streptococic prin reacţia de latexaglutinare
-testul coagulazei pentru stafilococi identifică *Staphylococcus aureus*
-testul de filamentare pentru levuri pentru identificarea *Candidei albicans*

a. Identificarea streptococilor beta hemolitici

Caractere microscopice

Streptococii sunt coci gram pozitivi dispusi in perechi sau in lanţuri scurte.

Caractere de cultură

Pe AS, dupa 18 ore de incubare aerobă la 37 grade, streptococii de grup A, C sau G formează colonii mici (0,5-1 mm diametru), transparente sau opace, înconjurate de o zonă largă de beta-hemoliză. Suprafaţa coloniilor poate fi neregulat mamelonată (colonii matt), lucioasă şi cu relief acuminat (colonii glossy) sau mucoidă. În absenţa coloniilor beta-hemolitice, urmărim cu atenţie hemoliza din jurul punctelor de înţepare a mediului. Dacă la acest nivel observăm beta hemoliza, se repică colonia din profunzimea înţepăturii cu incubare anaerobă a subculturii.

Testul catalazei

Pe o lama se pune o picătură din soluţia 20% de peroxid de hidrogen si cu o mică baghetă din lemn se suspensionează o colonie din cultura organismului de testat. Se urmăreşte 30 secunde aparitia bulelor de gaz.

Test pozitiv: apariţia bulelor de gaz până la efervescenţă.

Test negativ: absenţa bulelor.

Streptococii dau testul catalazei negativ.

Testul de sensibilitate la bacitracină

Se prelevă cu ansa o colonie de streptococ beta hemolitic si se însămânţează confluent un sector (1/4) din placa cu AS, efectuând striuri strânse şi suprapuse in 3 direcţii. În centrul ariei însămânşate se plasează un disc cu 0,04 U sau 0,1 U bacitracină. Se incubează 18 ore la 37 ^{0}C.

Test pozitiv: Orice zonă de inhibiţie în jurul discului cu 0,04 U bacitracină sau un diametru >11 mm in jurul discului cu 0.1 U bacitracină.

Test negativ: Absenţa zonei de inhibitie la 0,04 U bacitracină, respectiv inhibiţie cu diametrul mai mic de 11 mm in jurul discului cu 0,1 U bacitracină.

Diferenţierea streptococilor beta-hemolitici se face prezumtiv prin testul la bacitracină în: streptococi de grup A (sensibili in proportie de 99%) si non-grup A (rezistenti in proportie de 97%).

Reacţia de latexaglutinare

Identificarea antigenică a grupului Lancefield se realizează cu trusa de latex aglutinare si permite identificarea streptococilor beta-hemolitici non grup A (grup C sau G).

b. Identificare *Staphylococcus aureus*

Caractere microscopice

Pe frotiul colorat Gram efectuat din culturi pe mediu solid, stafilococii apar sub formă de coci rotunzi, dispuşi in grămezi neregulate, asemănătoare ciorchinelor de strugure.

Caractere de cultură

Obişnuit, coloniile de *S. aureus,* după incubare 18 ore la 37 ^{0}C pe mediu solid au aspect S, sunt cremoase, rotunde, cu diametrul de 2-3 mm, margini perfect regulate, suprafaţa netedă, bombată si lucioasă. Pe AS cu 5% sânge de berbec coloniile au o zona circulară de hemoliză în jur. Prezenţa pigmentului carotenoid, portocaliu sau galben citrin, este o caracteristica a tulpinilor de *S. aureus*, dar si a unor stafilococi coagulazo-negativi (*S. saprophyticus, S. hominis)*. Pigmentogeneza necesită prezenţa oxigenului şi este mai intensă la 20 grade C decât la 37. Nu toate tulpinile de *S. aureus* produc hemolizină sau pigment.

Testul catalazei

Stafilococii dau testul catalazei pozitiv: prin suspensionarea culturii de stafilococ într-o picatură din soluţia 20% de peroxid de hidrogen pe o lamă de sticlă, apar bule de gaz.

Testul coagulazei

Identificarea rapidă a speciei se face cu ajutorul reactivilor comerciali de aglutinare. Reactivii sensibilizaţi cu fibrinogen si IgG cuplează coagulaza legata respectiv proteina A din peretele *S. aureus*, ducând la aglutinarea amestecului dintre reactiv şi cultura de *S. Aureus.*

c. **I**

Identificare *Enterobacteriaceae*

Caractere microscopice: bacili gram negativi

Caractere de cultură: Fiind nepretenţioase nutritiv, cultivă pe toate mediile de cultură utilizate. Pe AS formează colonii „S” de 2-3 mm, bombate, rotunde, umede, cu suprafaţa netedă şi margini regulate sau colonii „R”, rotunde, plate, cu suprafaţa rugoasă şi margini neregulate. Unele tulpini dezvoltă hemoliză. Pe mediile lichide formele „S” tulbură uniform mediul, iar formele”R” tulbură mediul în grade diferite, cu inel si depozit.

Caractere biochimice: Se folosesc sistemele multitest: TSI (fermentarea lactozei, glucozei si producerea de hidrogen sulfurat), manita (fermentarea manitei, mobilitate si producere de urează), se testează producerea de indol, lizin decarboxilaza, citrat dehidrogenaza si fenilalanildezaminaza. Se poate face si identificarea automată pe galerii API.

d. Identificare *Candida albicans*

Examen microscopic

Se efecuează un frotiu colorat gram din exsudatul faringian (prelevat din depozitul pseudo-membranos al leziunilor). Are valoare diagnostică prezenţa în cantitate enormă de levuri, mai ales sub forma de pseudohife.

Caractere de cultură

Cultivarea se face pe un sector de placă Sabouraud cu cloramfenicol şi se incubează 18-24 ore la 37 ^{0}C, apoi se lasă la temperatura camerei 48-72 ore. Se urmăreşte prezenţa coloniilor mari, de 2-5 mm diametru, cremoase, albe sau crem, care degajă o aromă de drojdie.

Testul de filamentare

Se suspensionează câteva colonii de levuri într-o eprubetă ce conţine 0,5 ml ser sanguin. Se agită, se lasă la termostat 2-3 ore, se efectuează un preparat lamă-lamelă din suspensia obţinută şi se urmăreşte la microscop apariţia filamentelor. *Candida albicans* dă testul de filamentare pozitiv.

5.3.3.4. Antibiograma

Streptococii beta hemolitici şi-au păstrat nealterată marea sensibilitate la penicilină, dar au dobândit rezistenţă la alte antibiotice indicate in terapia anginelor (la eritromicină). Antibiograma se efectuează numai la cerere expresa (e.g., la pacienţii sensibilizaţi la peniciline). Antibiograma poate fi făcută pentru supravegherea epidemiologică a rezistenţei la aceste antibiotice, dar rezultatele rămân de uz intern.

Controlul de calitate

Materialele (mediile de cultură, reactivii si coloranţii) utilizate la prelucrarea exsudatului faringian si nazal sunt verificate cu tulpini de referinţă existente in laborator: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Aceste controale se efectuează la fiecare lot de mediu achiziţionat sau turnat in laborator.

Echipamentele sunt verificate (tehnic si metrologic) după un program prestabilit.

5.4. Prezentarea rezultatelor

Pentru identificarea microorganismului patogen se face corelarea caracterelor microscopice, de cultură, biochimice si antigenice.

Comunicarea rezultatelor

Se realizeaza prin întocmirea buletinului de analiză care cuprinde rezultatele examenului microscopic, a culturii si antibiogramei, daca a fost solicitată.

Examenul microscopic

Se efectuează numai in suspiciunea de:

a. Angina Vincent: prezenţa pe frotiul colorat gram a numeroşi bacili fusiformi gram negativi si spirochete in contextul unei reacţii inflamatorii.

b. Candidoza orofaringiană: prezenţa pe frotiul gram a numeroase levuri si pseudohife miceliene.

Rezultatul poate fi comunicat imediat.

Cultura exsudat faringian

Se raportează rezultatul prin prezenţa sau absenţa următoarelor microorganisme:

- Streptococ beta hemolitic (grup A, C sau G);
- *Staphylococcus aureus* este raportat ca fiind prezent/absent doar la cererea expresă a clinicianului sau în cazul în care pacientul are streptococ beta hemolitic prezent.
- *Candida* spp (daca s-a solicitat);
- *Enterobacteriaceae***,** Pseudomonas spp sau Acinetobacter spp (daca s-a solicitat portajul)

Se precizează: ”prezent streptococ beta-hemolitic prezumtiv de grup A sau non grup A”, dacă identificarea s-a bazat numai pe testul de sensibilitate la bacitracină; se indică grupul antigenic, daca identificarea a fost definitivă. Se poate nota si evaluarea semicantitativă a creşterii, prezenţa a mai puţin de 20 colonii pe placă semnificând portaj (e.g. angina virală sau cu altă etiologie la un purtător sănătos de streptococ beta hemolitic).

Izolarea predominantă şi în cantitate mare de *Staphylococus aureus, Klebsiella pneumoniae* sau alte *Enterobacteriaceae* ori *Pseudomonas aeruginosa* reflectă disbioza orofaringiana a unor pacienţi şi nu are neapărat semnificaţie clinică. Sunt comunicate numai la cerere expresă.

Pentru candidoza orofaringiană, valoare diagnostica are numai izolarea predominantă şi în cantitate mare de *Candida albicans*, rar *C. tropicalis*, în concordanţă

cu rezultatele microscopiei. Izolarea unei specii de *Candida* fără confirmarea frotiului direct este nesemnificativă.

Arcanobacterium haemolyticum. Pe o placă cu AS cu 3,5% NaCl se urmăresc coloniile mici (0,75 mm diametru), rotunde, uşor reliefate, discret hemolitice. Identificarea preliminară accesibilă laboratorului noastru cuprinde:

- examen microscopic al coloniilor pe frotiu colorat Gram: bacili gram pozitivi, ocazional aşezaţi în "V", lipsiţi de granule metacromatice;
- testul catalazei negativ.

Cultura exsudat nazal

Se raportează rezultatul prin prezenţa/absenţa de:
-Streptococ beta hemolitic de grup A,C sau G;
-*Staphylococcus aureus*.
- *Candida* spp (daca s-a solicitat);
- *Enterobacteriaceae***,** Pseudomonas spp sau Acinetobacter spp (daca s-a solicitat portajul)
Rezultatul se comunica scris în 24-72 ore; la solicitarea medicului, poate fi raportat si telefonic.

Antibiograma se comunica numai la cerere expresă.

5.5. Activităţi finale

5.5.1. Validarea

Validarea tehnică a analizelor este realizată de catre operator.
Validarea bioanalitică a rezultatelor este realizată de catre şeful de laborator.

5.5.2. Raportarea rezultatelor

Comunicarea rezultatelor se face:
- în scris prin buletinul de analiză care este trimis medicului curant sau pacientului; buletinul de analiză este semnat si parafat de catre responsabilul de analiză şi managerul tehnic.
- în baza de date a laboratorului şi spitalului;
- rezultatele urgenţelor se pot transmite telefonic medicului curant.

6. RESPONSABILITATI

6.1. Managerul tehnic:

Verifică şi aprobă prin semnătură şi parafează buletinul de analiză, cod F-PGL-5.8-01.

Oferă consultanţă beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită.

Execută analizele pentru care este responsabil şi validează rezultatul acestora prin semnătură şi parafă.

6.2. Responsabilul de analiză

Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize de uz intern,cod F-PGL-5.4-1C.

Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deserveşte compartimentul 01, din registrul de lucru cod RGL -4.4-03 C şi din registrul de comenzi interne-externe, cod RGL-4.4-01 I/E şi registrul de comenzi respinse cod RGL-4.4-02.

Examinează preparatele de microscopie optică şi culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, execută repicările, aglutinările pe lamă şi latex aglutinările, interpretează caracterele exoenzimatice dezvoltate de bacterii şi a aglutinărilor pe lamă, respectiv a latex aglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de laborator şi formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru, cod RGL -4.4-03 C. Întocmeşte şi tipăreşte buletinul de analiză,cod F-PGL-5.4-1C. Verifică, semnează şi parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01 îl prezintă managerului tehnic spre aprobare.

6.3. Asistentul de laborator

Preia tampoanele cu exsudate concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de receptură şi de la asistentul medical de la cabinetul de recoltare.

Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registru de lucru, cod RGL -4.4-03 C.

Transportă mediile de cultură şi sticlăria pregatită pentru utilizare, în compartimentul de lucru şi pregăteşte mediile de cultură pentru însămânţare.

Efectuează însămânţarea produselor biologice pe medii de cultură, pregăteşte preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic.

Transmite buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01 registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltă.

7. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02
- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 C
- Buletinul de analiză FGL-5.8-01

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 C

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICĂ

EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL URINEI

COD PSL - M1 - 04

Editia 1, Revizia 0
Din data 01.05.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

Elaborat:
Conf. Univ. Dr. Olivia Dorneanu

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1. SCOPUL ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

2. DOMENIUL DE APLICARE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

4. DEFINITII SI ABREVIERI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

4.1. DEFINITII ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

4.2. ABREVIERI **6**

5. DESCRIEREA ACTIVITATII ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5.1. CONDIŢII PREALABILE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5.2. RESURSE NECESARE **6**

5.3. EXECUTIA ANALIZEI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5.5.ACIVITATI FINALE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

6. RESPONSABILITATI **9**

7. INREGISTRARI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

8. ANEXE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

1.SCOP

Prezenta procedura descrie are ca scop determinarea cantitativa a bacteriuriei semnificative (folosind metoda ansei calibrate, respectiv urocultura cantitativă) si ascocierea ei cu piuria. Principalele semne paraclinice ale ITU sunt: piuria (prezenta inflamatiei) si bacteriuria (agentul etiologic).

2. DOMENIUL DE APLICARE

Prezenta procedură este utilizată în cadrul Laboratorului de analize medicale al Spitalul Clinic de Boli Infecţioase “Sf.Parascheva” Iaşi, compartimentul de Microbiologie 1. Prezenta procedură este indicata in diagnosticul etiologic al ITU determinate de microorganisme condiţionat patogene.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

3.1. MANUALUL CALITATII , Cod: MCL - 01
3.2. SR EN ISO 15189 :2007 - Cerinte particulare pentru calitate si competenta
3.3 SR ISO /TR 22869:2005 – Ghid pentru implementarea in laboratoare ISO 15189:2003
3.5. SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
3.6. SR EN ISO 9001 :2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
3.7. Dumitru Buiuc, Marian Neguţ. Tratat de Microbiologie Clinică. Ed. Medicală, Bucureşti, 2008.

4. DEFINITII SI ABREVIERI

4.1. Definitii

Urocultura: este o metode de lucru utilizata in laboratoare de microbiologie pentru analiza probelor de urina, constand in cultivarea si identificarea microorganismelor din urină. Metoda se practica ori de cate ori medicul clinician suspecteaza infectii ale tractului urinar.
Piurie: eliminarea leucocitelor in urina în cantitate de >10 leucocite/mmc.
Bacteriurie: eliminarea în urină a $>10^5$ UFC/mL bacterii condiţionat patogene aparţinând aceleaşi specii.

4.2. Abrevieri

ITU : infecţie a tractului urinar

ATCC: American Type Culture Colection
UFC: unităţi formatoare de colonii
TSI: Triple Sugar Iron (glucoză, zaharoză, lactoză, sare de fier)
MIU: mobilitate, indol, urează
SF: ser fiziologic
AD: apă distilată
BGN : bacili gram-negativi

5. DESCRIEREA ACTIVITATII

5.1. Condiţii prealabile

Anterior prelucrării probelor de urină, se efectuează instruiri ale personalului, de protectie a muncii şi securitate specifică analizei procedurale. Asistenta de la compartimentul Microbiologie 1 va purta achipament de protecţie corespunzător şi va prelucra hemocultura utilizând hota cu flux laminar din dotarea compartimentului.

5.2. Resurse necesare

5.2.1. Aparatură

- hotă cu flux de aer laminar (Lamil Plus 13)
- autoclav
- etuvă
- termostat (LEEC)
- frigider
- microscop (Optika B-350)
- lampă cu radiaţii ultraviolete
- bec de gaz Bunsen

5.2.2. Materiale şi reactivi

- cutii Petri cu medii turnate în laborator (agar-sânge, CLED, Uriselect agar Sabouraud, agar Mueller-Hinton)
- medii de identificare turnate în tuburi (TSI, mediu cu manită şi uree, Simmons, apă peptonată, mediu cu fenilalanină, mediu cu lizină, mediu cu bilă-esculină)
- reactiv pentru testul oxidazei
- apă oxigenată
- galerii de identificare stafilococi, bacili gram-negativi, levuri
- hârtie pH
- lame de microscop
- baterie de coloraţie Gram
- soluţie dezinfectantă
- pipete
- anse de însămânţare
- anse calibrate 10 µL

- scală nefelometrică McFarland
- microcomprimate pentru antibiogramă
- ser fiziologic
- tulpini de referinţă ATCC
- hârtie de filtru
- apă distilată
- pense
- eprubete
- ulei de cedru

5.3. Execuţia analizei.

Recoltare, transport şi conservare. Probele de urină pentru examen bacteriologic, recoltate în pavilion conform Manualului de recoltare PGL-5.4-1, sunt transportate la laborator în maxim o oră de la recoltare, unde sunt recepţionate şi înregistrate imediat. În intervalul orar în care laboratorul de microbiologie nu are activitate, probele de urină pentru examen bacteriologic etichetate corespunzător sunt conservate în frigiderul de probe al laboratorului.

Etichetare. Probele ajunse in laborator sunt preluate din camera de receptie de catre asistenta de compartiment. Probele sunt verificate din punct de vedere al calitatii si a datelor de identificare si sunt inregistrate in registrul de comenzi interne si primesc un numar curent de registru regasit pe frotiuri şi culturi.

Examen microscopic. Se omogenizează urina cu grijă, prin agitare. Se imersează imediat ansa sterilizată prin ardere la roşu şi răcită sub nivelul fluidului şi i se imprimă câteva mişcări pe verticală în sus şi în jos. Se retrage ansa din fluid în poziţie verticală şi cu viteză moderată a mişcării. Se descarcă ansa pe o cameră de numărat Fuchs-Rosenthal. Se numără leucocitele pe 4 pătrate mari în diagonală, se înmulţeşte numărul cu 4 şi se împarte la 3 pentru a obtine numărul de leucocite per mmc urină. Eliminarea a până la 3 leucocite per mmc este normală. Se observă concomitent prezenţa celulelor epiteliale de descuamare; peste 5 CES/câmp semnifică o probă contaminată.

O picatura din urina omogenizata se depune in centrul unei lame de microscop, fara etalare. Dupa uscare si fixare se coloreaza Gram. Se urmareste prezenta bacteriilor si se apreciaza numarul lor per camp microscopic examinat cu imersia. Prezenta a 1-2 bacterii din aceeasi categorie microscopica per camp este asociata cu bacteriuria semnificativa.

Însamântare.

a. Metoda ansei calibrate. Toate probele de urină sunt însămânţate prin epuizare cu ansa calibrată de 10 µL pe câte un sfert de placă de agar-sânge/Uriselect.

b. Urocultura cantitativă. Din probele de urină cu piurie se face urocultură cantitativă. Se plasează 1 ml ser fiziologic steril într-un flacon de sticlă steril. Se adaugă 10 µl

urină omogenizată, se amestecă viguros. Se extrag 100 µl urină astfel diluată şi se plasează in centrul unei plăci Petri cu agar CLED. Se epuizează imediat inoculul pe toată suprafaţa plăcii. Daca la examenul microscopic al frotiului colorat Gram din urina omogenizata se observa o categorie microscopica ce ar putea corespunde unei bacterii pretentioase nutritiv, se vor insamanta si mediile corespunzatoare.

Incubare. Se incubează plăcile la 35° - 37°C peste noapte.

Citirea culturilor. Se numără diferentiat, pe tipuri, coloniile dezvoltate.
Se calculeaza bacteriuria dupa formula:
a. Metoda ansei calibrate. X = N x 100
b. Urocultura cantitativă. X= N x D x 1/vol. insamântat,
X = numarul de UFC/ml
N = numarul coloniilor de acelaşi fel pe sector, respectiv, pe placa;
D = factorul de dilutie (inversul dilutiei = 100).

Citirea probelor.
Culturi negative
<1000UFC/ml
O singură specie este izolată între 10.000- 100.000 UFC/ml
Se comunică numarul acestora in UFC/ml si se precizeaza coci Gram pozitivi, bacili Gram negativi.
Se pot face identificarea la nivel de specie si testarea sensibilitatii la antibiotice, in prezenţa piuriei sau la cererea clinicianului. Se recomandă repetarea recoltei.
O singura specie predominant şi în cantitate mare
Au semnificaţie clinică, în prezenţa piuriei:
>100.000 UFC/ml bacili gram-negativi (*Enterobacteriaceae*, BGN non-fermentativi)
>50.000 UFC/ml stafilococi (*S. aureus, S.saprophyticus*)
>10.000 UFC/ml levuri
Mai multe specii >100.000 UFC/ml
Prezenţa mai multor specii predominant şi în cantitate mare este cel mai frecvent asociată cu contaminarea probei. Se recomandă repetarea recoltei. Un diagnostic microbiologic corect necesita informatii clinice despre pacient oferite de catre medicul curant.

Identificarea si antibiograma.
Pentru izolatele cu semnificaţie clinică (>100.000 UFC/ml, asociate piuriei) se continuă investigaţia prin identificare (vezi Identificarea bacteriilor) şi prin testarea sensibilităţii la antibiotice (vezi Antibiograma difuzimetrică).

Controlul intern de calitate. Se efectueaza controlul intern de calitate al mediilor turnate, al antibiogramei difuzimetrice, al metodelor de identificare .

5.4. Prezentarea rezultatelor.
Raportarea rezultatelor se face sub urmatoarea forma:
Negative: <1000UFC/ml

Absent: *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., BGN non-fermentativi, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., streptococi, levuri
Pozitive: >100.000 UFC/ml, identificarea microorganismului şi antibiograma corespunzatoare.

5.5. Activităţi finale.

După prelucrarea urinei, se închide hota, se decontaminează suprafeţele de lucru, se pune în funcţiune lampa cu ultraviolete. Proba de urină prelucrată se conservă în frigiderul de probe până la eliberarea rezultatului, apoi se aruncă în containerul dedicat, cu insemnele de pericol biologic.
După prelucrarea subculturilor se închid şi depozitează în frigider kiturile de latex aglutinare utilizate, microcomprimatele cu substanţe antimicrobiene.
După examinarea frotiurilor se închide microscopul şi se efectuează mentenanţa la sfârşitul zilei lucrătoare.

6. RESPONSABILITATI

Medicul responsabil de analiză:

- citeste si interpreteaza rezultatele
- efectueaza controlul intern si extern de calitate
- valideaza rezultatul prin semnatura şi parafă

Asistentul de laborator:

- Inregistreaza proba in registrul de evidenta a analizei
- Verifica functionarea mijloacelor de incercare si / sau masurare
- Pregateste probele pentru a fi citite de catre responsabilul de analiza conform procedurii specifice
- Comunica orice problema intervenita in timpul prelucrarii probelor
- Inregistreaza rezultatele

7. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02
- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 D
- Buletinul de analiză F-PGL-5.8-01

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 D

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICĂ
EXAMENUL
MICROBIOLOGIC AL SPUTEI

COD: PSL – M1 – 05

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

ELABORAT
Responsabil de analiză
Dr. Olga Filip

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE DOCUMENTE

Denumirea documentului :

Locul difuzării	Primit				Retras		
	Nr. ex.	Data	Nume	Semn.	Data	Nume	Semn.
R. C	0.		As. Lorena Zaborila				
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânaru				
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu				

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1. SCOP 5
2. DOMENIUL DE APLICARE 5
3. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ 5
3.1. MANUALUL CALITATII 5
3.2. SR EN ISO 15189 :2007 5
3.3 SR ISO /TR 22869:2005 5
3.4.SR EN ISO 15190 :2005 5
3.5 Manualul de recoltare a probelor biologice 5
3.6 - D.Buiuc, M.Neguţ, Tratat de microbiologie clinica 5
3.7 D.Buiuc, Microbiologie medicală- Ghid pentru studiul şi practica medicinei 5
4. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI 6
5. DESCRIEREA ACTIVITĂŢII 6
5.1 CONDIŢII PREALABILE 6
5.2 RESURSE NECESARE 6
5.3 EXECUŢIA ANALIZEI 7
5.3.1. Lista bacteriilor posibil izolate din infecţiile TRI: 7
5.3.2. Examenul macroscopic 8
5.3.3. Spălarea sputei 8
5.3.4. Microscopia 8
5.3.3. Cultivarea probei 9
5.4.Prezentarea rezultatelor 11
5.5. Activităţi finale 11
6. RESPONSABILITĂŢI 11
7. ÎNREGISTRĂRI 12
8. ANEXE 12

1. SCOP

Scopul acestei proceduri este de a prezenta modul de organizare şi desfăşurare a etapelor determinării examenului microbiologic al sputei în conformitate cu cerinţele impuse de normele de calitate în vigoare, în vederea demonstrării competenţei laboratorului nostru.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul în cadrul Compartimentului de Microbiologie 01 al laboratorului **Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf. Parascheva„ Iaşi,** de către personalul medical angajat şi instruit în acest sens, pentru determinarea examenului microbiologic al sputei, de la prelevare până la eliminarea probelor şi eliberarea buletinului de analiză.

3. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ

3.1. MANUALUL CALITATII , Cod: MCL – 01, Ed. 1 Rev. 0

3.2. SR EN ISO 15189 :2007 - Cerinte particulare pentru calitate si competenta

3.3 SR ISO /TR 22869:2005 – Ghid pentru implementarea in laboratoare ISO 15189:2003

3.4.SR EN ISO 15190 :2005- Laboratoare medicale. Cerinţe pentru securitate.

3.5 Manualul de recoltare a probelor biologice, cod MRP 01 , Ed.1, Rev.0

3.6 - D.Buiuc, M.Neguţ, Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,Bucureşti, 2008

3.7 D.Buiuc, Microbiologie medicală- Ghid pentru studiul şi practica medicinei, **Ed.Gr T Popa Iasi 2003.**

4. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI

PS = procedura specifică
PO = procedura operaţională
PG = procedura generală
TRS = tractus respirator superior
TRI = tractus respirator inferior
SPUTA = Probă obţinută de la pacienţii cooperanţi prin tuse spontană, profundă şi supravegheată, după periajul dinţilor şi clătirea energică a gurii.
PMN: polimorfonucleare neutrofile
CI: celule inflamatorii
CES: celule epiteliale scuamoase
UFC: unităţi formatoare de colonii
BAAR: bacili acido-alcoolo-rezistenţi
AS: mediu agar cu 5% sânge pentru cultivarea microorganismelor pretenţioase şi nepretenţioase
M.H. - Mediu Müeller-Hinton, cu valoare nutritivă, care permite dezvoltarea optimă a unei mari varietăţi de germeni şi nu conţine inhibitori ai acţiunii unor substanţe antimicrobiene.
SabC – Agar Sabouraudcu cloramfenicol, mediu agarizat selectiv pentru izolarea şi studiul fungilor.

5. DESCRIEREA ACTIVITĂŢII

5.1 CONDIŢII PREALABILE

Anterior recoltării sputei, pacientul trebuie instruit astfel încât să înţeleagă diferenţa dintre a expectora şi a scuipa. Dacă proba apare constituită în principal din salivă, cu aspect mucoid spumos sau apos, trebuie insistat imediat pentru prelevarea unei noi probe corespunzătoare calitativ, care va fi transportată la laborator..
Anterior prelucrării sputei, se efectuează instruiri ale personalului de protectie a muncii şi securitate specifică analizei procedurale. Asistenta de la compartimentul Microbiologie 1 va purta achipament de protecţie corespunzător şi va prelucra sputa utilizând hota cu flux laminar din dotarea laboratorului/compartimentului.

5.2 RESURSE NECESARE

Echipamente:
-hota cu flux laminar
-termostat
-frigider
-lampa UV

-microscop optic

Resurse:
-anse;
-lame microscop;
-ulei de cedru;
-bec de gaz Bunsen;
-baie colorare;
-cutii Petri;
-densimat/scala nefelometrica Mc Farland;
-pense;
-pipete semiautomate;
-pipete sterile;
-vârfuri albastre şi galbene pentru pipete semiautomate;
-cristalizor/recipiente pentru solutii dezinfectante;
-lame/lamele;
-containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

Reactivi şi alte substanţe:

-medii de cultură: agar cu 5% sânge de berbec, agar Sabouraud cu cloramfenicol;
-materiale de control;
-discuri pentru antibiogramă;
-discuri de optochin;
-trusa de coloratie Gram şi Ziehl-Neelsen;
-ser fiziologic;
-soluţii dezinfectante;
-trusă de latex aglutinare pentru identificarea streptococilor beta-hemolitici;
-trusă de latex aglutinare pentru determinarea coagulazei;
-reactiv pentru oxidază;
-baterie de teste de identificare biochimică a bacteriilor;
-tulpini de referinţă.

Mediile de cultură sunt preparate în laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind însoţit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerinţele specificate (grosime turnat în placă, pH-ul mediului, sterilitatea,etc).

5.3 EXECUŢIA ANALIZEI

5.3.1. Lista bacteriilor posibil izolate din infecţiile TRI:

- Streptococcus pneumoniae

- Haemophilus influenzae
- Staphylococcus aureus
- Moraxella catarrhalis
- bacili Gram negativi aerobi din familia Enterobacteriaceae
- bacili Gram negativi glucozo-nefermentativi
- fungi.

5.3.2. Examenul macroscopic

Sputa corespunzătoere calitativ recoltată conform procedurii din manualul de recoltare poate fi vâscoasă, purulentă de culoare galbenă, verzuie, ruginie sau cu urme de sânge.

Sputa necorespunzătoare va fi înregistrată în condica de probe respinse (cod RGL 4.4-02).

5.3.3. Spălarea sputei

Probele de spută mucopurulentă vor fi decontaminate prin spălare în 3 băi succesive de soluţie salină izotonă (ser fiziologic). Spălarea dezagregă probele fluide, care nu trebuie examinate în continuare, fiind de calitate necorespunzătoare.

La prima spălare se toarnă peste probă, în recipientul de prelevare, o cantitate de ser fiziologic şi se agită pentru separarea exsudatului bronhopulmonar de secreţiile oro-faringiene.

Apoi se repartizează în două plăci Petri cca 20 mL ser fiziologic. Se prelevă cu ansa porţiuni purulente din proba prespălată şi se agită câte 15+20 de secunde în fiecare din următoarele băi de spălare.

5.3.4. Microscopia

Se absoarbe pe un dreptunghi de hârtie de filtru excesul de fluid de pe câte un fragment mucopurulent şi se etalează pe 3 lame de microscop în strat cât mai subţire şi uniform, evitând dilacerarea exsudatului prin mişcări de du-te-vino ale ansei. După uscare, frotiurile se fixează prin căldură şi se colorează:

- primul Gram, pentru triajul citologic de calitate al probei şi bacterioscopie;
- al doilea Ziehl-Neelsen, pentru urmărirea bacililor acido-alcoolo-rezistenţi
- al treilea se păstrează necolorat, ca rezervă în caz de nevoie (coloratie defectuoasă, spargerea unei lame).

5.3.4.1. Examinarea frotiului colorat Gram

5.3.4.1.1. **Triajul citologic de calitate** al sputei se face cu putere de mărire 100x (obiectiv de 10x). În zonele bine etalate, cu celulele dispuse în monostrat, se determină pe 5-10 câmpuri numărul mediu al celulelor inflamatorii (CI) şi al celulelor epiteliale scuamoase (CES) şi prezenţa sau absenţa fibrinei. Pe această bază se efectuează scorul de calitate Q propus de Bartlett şi colab. Conform tabelului 1.

Nr. celule per câmp microscopic la mărire 100x	Calificative pentru celule inflamatorii (CI)	Calificative pentu celule epiteliale scuamoase (CES)
0	0	0
1-9	0	0
10-24	+1	-1
≥25	+2	-2

Scorul Q este suma algebrică a calificativelor pentru CI şi CES +1 pentru prezenţa fibrinei sau +0 în absenţa acesteia.

Sunt acceptate pentru bacterioscopie şi sputocultură numai probele cu scorul Q de cel puţin +1.

5.3.4.1.2. **Bacterioscopia cantitativă**. Se selectează şi examinează cu putere de mărire 1000x cât mai multe câmpuri bine etalate şi corect diferenţiate tinctorial, cu cel puţin 3 CI şi la distanţă de cel puţin 3 diametre, în orice direcţie, de CES. Pe aceste câmpuri se determină numărul mediu de bacterii din aceeaşi categorie microscopică/câmp.

Asocierea cu PMN a cel puţin 10 bacterii din aceeaşi categorie microscopică are predicţie pozitivă de peste 0,9 pentru izolarea în sputocultură a unui patogen din aceeaşi categorie microscopică în cantitate de cel puţin 100.000 UFC/mL (asociere semnificativă clinic).

5.3.4.2. Examinarea frotiului colorat Ziehl-Neelsen

Se examinează cu putere de mărire 1000x , câmp cu câmp (2-5 secunde pe câmp), evitând mişcarea continuă a lamei. Dacă pe primele 100 de câmpuri sunt depistaţi 1-3 bacili sau nu au fost observaţi deloc, se continuă examenul pe alte 100 de câmpuri. Artefacte acido-rezistente sunt uşor de confundat cu bacilii acido-alcoolo-rezistenţi, de aceea observarea numai a câtorva bacili pe tot frotiul se consemnează ca suspiciune şi se solicită examinarea unei noi probe.

5.3.3. Cultivarea probei

5.3.3.1. Medii utilizate: Proba de spută se cultivă pe o placă de agar sânge şi jumătate de placă de SabC, din câte un fragment mucpourulent din care a fost eliminat excesul de lichid pe hârtia de filtru sterilă.

AS permite izolarea majorităţii bacteriilor implicate în etiologia infecţiilor de TRI, iar o strie de Staphylococcus aureus însămânţată peste ariile de epuizare a probei permite, prin fenomenul de satelitism, izolarea şi identificarea în cultură primară a H. influenzae.

Utilizarea mediilor diferenţiale lactozate este opţională, fiind utilă pentru urmărirea eventualilor bacili Gram negativi reperaţi microscopic.

Mediul SabC este utilizat pentru izolarea fungilor.

5.3.3.2. Izolarea semicantitativă: Se epuizează în 4 cadrane pe placa de AS o ansă din proba de spută spălată. Se însămânţează pe aceeaşi placă, perpendicular pe striurile sectoarelor 2-4 de epuizare, câte o strie de S. aureus. Opţional, în cazul depistării microscopice a pneumococilor se poate plasa în al doilea sector de epuizare a probei pe placa de AS a unui disc de optochin 4 µg.

5.3.3.3. Incubarea plăcii de AS se face in condiţii de aerobioză cu 5% CO_2, peste noapte, la 37˚C. Incubarea plăcii SabC se face peste noapte, la 30˚C, iar cultura se urmăreşte până la 48 de ore la temperatura camerei.

A doua zi, se examinează culturile şi se înregistrează semicantitativ izolatele pe tipuri de colonii.

Din expectoraţiile care îndeplinesc exigenţele citologice de calitate şi sunt prelucrate conform specificaţiilor, izolăm numai una-două bacterii cu creştere 3+ sau 4+ după epuizarea semicantitativă. În cazul probelor cu mai mult de 3 izolate în cantitate mare se sistează identificarea şi nu se tentează antibiograma pentru că nu putem argumenta semnificaţia clinică în mod convingător.

5.3.3.4. Identificarea izolatelor se face conform procedurii operaţionale de identificare a bacteriilor.

Streptococii α-hemolitici trebuie diferenţiaţi în pneumococi, cu posibilă semnificaţie clinică, şi streptococi viridans, fără semnificaţie clinică. Sensibilitatea la optochin (diametru ≥14 mm) identifică prezumtiv pneumococii.

Streptococii beta-hemolitici trebuie identificaţi prin latex-aglutinare.

Hemofilii sunt identificaţi până la nivel de specie pe baza caracterelor de cultură şi a necesităţilor nutritive în factorii X şi V.

Moraxella catarrhalis sunt identificate după caracterele de cultură (colonii alb-cenuşii, friabile şi intens oxidazopozitive), microscopice şi asocierea lor microscopică cu CI.

Enterobacteriaceele vor fi identificate utilizând bateria de teste biochimice, în circumstanţe clinico-epidemiologice sugestive şi în cazul asocierii cito-bacteriologice cu asociere semnificativă cu CI.

Bacilii Gram negativi nefermentativi sunt identificaţi pe baza caracterelor microscopice, de cultură, biochimice şi reacţia oxidazei (pozitivă pentru P. aeruginosa, negativă pentru Acinetobacter spp.).

S. aureus se impune identificat, spre deosebire de stafilococii coagulzo-negativi, pe care îi înregistrăm fără a-i comunica. Identificarea se face pe baza caracterelor de cultură, microscopice şi testul coagulazei pozitiv.

Fungii sunt raportaţi în cazul pacienţilor imunosupresaţi, cu asociere semnificativă microscopic.

5.4.Prezentarea rezultatelor

Pe buletinul de analiză (cod FGL-5.8-01) se raportează:

- rezultatele microscopiei, scorul de calitate, asocierea semnificativă a unei categorii microscopice se bacterii cu CI, prezenţa sau absenţa BAAR
- Rezultatele culturii sunt comunicate cu genul şi specia bacteriei crescute în cantitate mare, alături de rezultatele antibiogramei citite şi interpretate conform procedurii de efectuare a antibiogramei.
- Opţional, putem face referire la semnificaţia clinică a tulpinii izolate şi identificate.

5.5. Activităţi finale

După prelucrarea sputei, se închide hota, se decontaminează suprafeţele de lucru, se pune în funcţiune lampa cu ultraviolete, se aruncă proba de spută prelucrată în containerul dedicat, cu insemnele de pericol biologic.

După prelucrarea secundară a culturilor se închid şi depozitează în frigider kiturile de latex aglutinare utilizate, microcomprimatele cu substanţe antimicrobiene.

După examinarea frotiurilor se închide microscopul şi se efectuează mentenanţa la sfârşitul zilei lucrătoar.

6. RESPONSABILITĂŢI

6.1. MANAGERUL TEHNIC:

Verifică şi aprobă prin semnătură şi parafează buletinul de analiză. Oferă consultanţă beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită.

Execută analizele pentru care este responsabil şi validează rezultatul acestora prin semnătură şi parafă.

6.2. RESPONSABILUL DE ANALIZĂ

Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deserveşte compartimentul 01, din registrul de lucru cod RGL-4.4-03-E şi din registrul de comenzi interne, cod RGL 4.4-

01 I registrul de comenzi externe cod, RGL 4.4-01 E şi registrul de comenzi respinse cod RGL-4.4-02.

Examinează preparatele de microscopie optică şi culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, interpretează caracterele exoenzimatice dezvoltate de bacterii şi a aglutinărilor pe lamă, respectiv a latex aglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de laborator şi formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru, cod RGL-4.4-03-E.

Întocmeşte şi tipăreşte buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01.

Verifică, semnează şi parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01 şi îl prezintă managerului tehnic spre aprobare.

6.3. ASISTENTUL DE LABORATOR

Preia urocultoarele în care a fost recoltată sputa concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de recepţie.

Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registrul de lucru, cod RGL-4.4-03-E.

Transportă mediile de cultură şi sticlăria pregatită pentru utilizare în compartimentul de lucru şi pregăteşte mediile de cultură pentru însămânţare.

Efectuează însămânţarea produselor biologice pe medii de cultură, pregăteşte preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic.

Execută repicările, aglutinările pe lamă şi latex aglutinările solicitate de responsabilul de analiză.

Transmite buletinul de analiză, registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltă.

7. ÎNREGISTRĂRI

Se efectuează în timp real, în:

1. Registrul de comenzi interne/externe RGL 4.4-01 I/E
2. Registrul de lucru, cod RGL-4.4-03-E, ataşat procedurii PSL-M1-05
3. Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02 (daca e cazul)
4. Buletin de analiza FGL-5.8-01.

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 E.

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICA

EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL EXSUDATELOR GENITALE

COD: PSL – M1 - 06

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

ELABORAT
Responsabil de analiză
Dr. Olga Filip

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1.SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ
4. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
5.1. CONDIŢII PREALABILE
5.2. RESURSE NECESARE
5.3. CONŢINUTUL PROCEDURII (EXECUŢIA ANALIZEI, ACTIVITĂŢI)
5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
5.5. ACTIVITĂŢI FINALE
6. RESPONSABILITĂŢI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

1. SCOPUL

Procedura descrie activităţile şi etapele privind prelucrarea secretiilor vaginale şi uretrale în scopul stabilirii diagnosticului etiologic în infectţi ale tractului genital feminin şi masculin.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecţioase „Sf. Parascheva" Iaşi.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- MANUALUL CALITATII
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguţ,Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,Bucureşti, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977
- Prospectele kit-urilor de reactivi
-

4.DEFINIŢII SI ABREVIERI

4.1.Definiţii

4.1.A. Uretrita reprezintă inflamaţia mucoasei uretrale.
Secreţia uretrală – o scurgere uretrală mai abundentă sau mai discretă, continuă sau surprinsă mai frecvent înaintea micţiunii matinale, semn important al uretritei. .
Sub raport etiologic, uretritele se clasifică în:
- Uretrite gonococice cu incubaţie scurtă de 4 zile, disurie marcată şi scurgere uretrală uzual purulentă; netratate se cronicizează şi dau complicaţii ca prostatite, epididimite, artrite.
- Uretite nongonococice, cu incubaţie de 7-14 zile şi disurie mai puţin intensă, sunt determinate de: *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis* , virusul *Herpes simplex* sau bacili gram negativi.
- Uretrite postgonococice, frecvente în condiţii de promiscuitate sexuală sunt determinate de o dublă infecţie (cu gonococ şi *C. trachomatis* sau *U. urealyticum*), de reinfecţii gonococice sau de eşec terapeutic, prin infecţia cu o tulpină de gonococ producătoare de beta lactamaze şi multiplu rezistenta la antibiotice

4.1.B. Secreţia vaginală reprezintă un transudat al mucoasei vaginale, ce conţine celule epiteliale şi flora microbiană care diferă în funcţie de vârstă, stări fiziologice sau patologice: de la apariţia menstruaţiei şi până la menopauză predomină lactobacilii, iar de la naştere până la pubertate şi după menopauză flora vaginală e reprezentată de stafilococi, streptococi, difterimorfi.
Leucoree= scurgere vaginală abundentă, determinată de o inflamaţie difuză vulvo-

vaginală. Sub raport etiologic vaginitele se clasifică în :specifice (determinate de *Neisseria gonorrhoeaea, Trichomonas vaginalis si Candida albicans*) şi nespecifice sau vaginoze. .

Vaginozele reprezintă un sindrom infecţios neinflamator,caracterizat prin scurgeri alb-cenuşii cu miros de peşte alterat; apar prin înlocuirea florei lactobacilare normale cu o asociaţie dintre *Gardnerella vaginalis*, bacterii anaerobe şi *Mycoplasma hominis*.

4.2. Abrevieri

AS: mediu agar cu 5 % sânge;
Ach: agar chocolat;
McC: agar Mac Conkey;
BCC: bulion cord creier;
SabC: mediul Sabouraud cu cloramfenicol;
PMN: polimorfonucleare neutrofile
H: hematii
L: leucocite
CES: celule epiteliale scuamoase
BGN: bacili gram negativi
BGP: bacili gram pozitivi
CGP: coci gram pozitivi

5. DESCRIEREA PROCEDURII

5.1. Condiţii prealabile

Operatorul care efectuează analiza va purta echipament de protecţie si va respecta normele de protecţia muncii si de lucru specifice laboratorului.

Pregătirea materialelor de laborator

Mediile de cultură,coloranţii se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri şi recipiente şi apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice.

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticluţe, flacoane) este pregatită pentru utilizare de către asistentul de laborator.

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură şi sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2- 3 zile şi se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură şi în cutii cu capac eprubetele, sticluţele şi lamele.

5.2. Resurse necesare

Echipamente

-hota cu flux laminar
-termostat
-frigider;
-lampa UV
-microscop optic

Resurse

-anse;
-lame microscop;
-ulei de cedru;
-bec de gaz Bunsen;
-baie colorare;
-cutii Petri;
-tampoane exsudat;
-densimat/scala nefelometrica Mc Farland;
-pense;
-pipete automate;
-pipete sterile;
-varfuri albastre si galbene pentru pipete automate;
-cristalizor/recipiente pentru solutii dezinfectante;
-lame/lamele;
-eprubete sterile de 10/10;
-stative eprubete;
-containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

Reactivi

- medii de cultură: agar cu 5% sânge de berbec, agar chocolat, agar Mac Conkey,agar Sabouraud;
- materiale de control, tulpini de referinţă;
- discuri pentru antibiogramă;
- trusa de coloratie Gram, albastru de metilen şi May- Grunwald- Giemsa;
- ser fiziologic;
- soluţii dezinfectante;
- trusa de identificare grup streptococi;
- trusa de identificare *Staphylococus aureus*
- medii de identificare a bacililor gram negativi (TSI, manita, indol, fenilalanin dezaminaza, citratdecarboxilaza)

Mediile de cultură sunt preparate în laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind insoţit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerinţele specificate (grosime turnat in placă, ph- ul mediului, sterilitatea, etc).

5.3. Conţinutul procedurii

Proba este reprezentată de tamponul cu secreţie uretrală/vaginală prelevat.
Principiul biologic care stă la baza examinării secretiei uretrale/vaginale constă în recoltarea şi cultivarea produsului patologic, izolarea, identificarea agentului patogen şi determinarea sensibilităţii la antibiotice.

5.3.1. Recoltarea

Recoltarea şi transportul la laborator se efectuează conform instrucţiunilor descrise in PO- 06 „ Manualul de recoltare a produselor biologice”.

5.3.1.A. Secreţia uretrală se recoltează la cel puţin 2 ore după micţiune. Se prelevă pe tampon secreţia uretrală spontană sau provocată prin expresia postero-anterioară a uretrei şi comprimarea glandului. În suspiciunea infecţiei cu *Trichomonas vaginalis* recoltarea se face înaintea micţiunii matinale şi tamponul se imersează într-un tub cu 1 ml soluţie salină izotonă preîncălzită la 37 grade.

5.3.1.B. Secreţia vaginală

Pentru infectiile genitale joase recoltarea produselor patologice se efectuează în cabinetul de ginecologie, cu instrumentar adecvat, de obicei din fundul de sac vaginal posterior. Secretţa vaginală se recoltează cu două tampoane : un tampon pentru frotiuri (3) care se prepară extemporaneu şi unul pentru culturi. Dacă se presupune o infecţie cu Trichomonas vaginalis, se recoltează al treilea tampon care va fi utilizat pentu efectuarea unui preparat umed lama-lamela.

În caz de bartolinite, la palparea glandei apare un exsudat purulent ce se va recolta pe două tampoane sterile.

La fetiţe virgine cu leucoree, secreţia se recoltează de la nivelul orificiului de deschidere a vaginului, recurgând la 3 tampoane pentru frotiuri si culturi.

5.3.2. Transportul

Transportul probelor la laborator se face uzual în maxim 2 ore de la prelevare, exceptând unele situaţii speciale.Secreţia uretrală/vaginala trebuie trimisa imediat la laborator când există suspiciunea infectiei determinata de *Neisseria gonorrhoeae* sau *Trichomonas vaginalis*. Pentru *Chlamydia trachomatis* este recomandat transportul tamponului în 2 ml de mediu SPG (zaharoza- fosfat- glutamat) .

5.3.3. Procesarea produsului biologic

Asistentul care deserveşte compartimentul de microbiologie 1 preia tampoanele cu secretie uretrala/vaginala şi formularele de solicitare analize de la registratorul medical, apoi le înregistrează în registrul de lucru, notand date de identificare pacient, analiza si numele operatorului.

În registrul de lucru se notează: numărul curent al probei, data, ID pacient, vârsta, diagnosticul, antibioterapia efectuată, denumirea analizei, metoda folosită, numele operatorului şi numele celui care validează analiza.

Etapele examenului microbiologic sunt:

Prelevatul recoltat pe tampon este însămânţat prin descărcare şi dispersie pe plăcile cu medii de cultură indicate pentru fiecare tip de produs, iar apoi tamponul se rulează pe trei lame de microscop curate şi se efectuează frotiuri. Se colorează un frotiu cu albastru de metilen, unul gram, iar al treilea este de rezervă.

5.3.3.A. Prelucrarea secreţiei uretrale

Se pregătesc plăcile cu MC utilizate pentru însămânţare (se scot de la frigider, se usucă suprafaţa lor la termostat şi se notează ID-ul probei pe plăci) şi 2 lamele de microscop curate pentru efectuarea frotiurilor, notându-se cu creionul pe marginea lamei

ID-ul probei.Tamponul cu secretţe uretrală este însămânţat prin descărcare şi dispersie pe cate o placa cu AS, Ach, McC (si pe o placa cu SabC, daca se solicita). Pentru economie se poate folosi cate 1/2 placa din fiecare MC.

Din al doilea tampon se efectuează 3 frotiuri pe lame de microscop curate prin rotirea tamponului pe toate feţele. Frotiurile sunt uscate prin căldură şi se colorează unul gram şi unul cu albastru de metilen, celălalt fiind păstrat de rezervă.

Incubarea placilor se face 18- 24 ore la 35^0C – 37^0C, uzual aerobă, cu prelungirea incubării până la 48 ore, dacă la 24 ore nu s-au dezvoltat culturi. Placa cu mediul SabC este incubata 24 ore la 37º si apoi 7 zile la temperatura camerei.

Examenul microscopic

Uzual, diagnosticul de laborator trebuie să ateste prezenţa sau absenţa gonococului. Dacă proba a fost purulentă, examinarea poate începe direct cu imersia; în cazul probelor muco- purulente sau mucoide, sunt reperate insulele de celule inflamatorii cu obiectivul 10X şi apoi se face examinarea cu imersia.Se observă celule inflamatorii, celule epiteliale scuamoase sau celule cuboide ale uroepiteliului. Prezenţa a mai mult de 1 PMN/ câmp examinat cu imersia se corelează cu uretrita acută. La pacienţii cu iritaţie uretrală depistarea unei reacţii inflamatorii minime sugerează infectia. În prelevatele din uretra distală prezenţa extracelulară a florei mixte (gram pozitivă, gram negativă) este normală. Prezenţa diplococilor gram negativi dispuşi în „boabe de cafea", intra- şi extracelular sugerează diagnosticul de uretrită gonococică.

Dacă se constată prezenţa reacţiei inflamatorii, dar bacterioscopia este negativă, frotiul de rezervă se colorează Giemsa şi se examinează pentru depistarea protozoarului *Trichomonas vaginalis* .*T. vaginalis* determină 5 % din uretrite la bărbat şi apare pe frotiul colorat Giemsa piriform, cu nucleul situat la polul anterior, avand mărimea unui macrofag. Prezenţa levurilor pe câmpuri repetate semnifică etiologia candidozică a uretritei, în timp ce depistarea câtorva levuri pe întreg frotiul nu are semnificaţie clinică.

Citirea culturilor Citirea plăcilor se realizează dupa 24-48 ore şi se urmăreşte dezvoltarea culturilor de microorganisme implicate în etiologia uretritelor nespecifice: *Staphylococcus aureus* pe AS, *Enterobacteriaceae, Acinetobacter* si *Pseudomonas aeruginosa* pe AS si McC, *Candida* spp pe mediul SabC.

Identificarea

Identificarea izolatelor se face prin : examen microscopic, caractere de cultură, caractere biochimice şi identificare antigenică.
Pentru identificare se efectuează frotiu din cultură şi se pot utiliza următoarele teste: catalaza, oxidaza (pozitivă la gonococi şi *Pseudomonas aeruginosa)* , testul coagulazei (pentru stafilococi) , mediile TSI, manita cu uree, reacţia indolului, citrat Simmons pentru *Enterobacteriaceae*, test de filamentare pentru levuri.

Neisseria gonorrhoeae

- Examen microscopic: diplococi gram negativi, cu diametrul de 0,6-1 mm, feţele adiacente reniforme sau aplatizate (în boabe de cafea);
- Caractere de cultură: pe Ach ,dupa 24-48 ore incubare în atmosferă de CO2 la 37º C, formează colonii S transparente, de 1-2 mm diametru, rotunde, cu margini regulate, netede, lucioase;
- Caractere biochimice: testul oxidazei pozitiv.

Staphylococcus aureus

- Examen microscopic: stafilococii apar sub formă de coci rotunzi, dispuşi in grămezi neregulate, asemănătoare ciorchinelor de strugure.

-Caractere de cultură: Obişnuit, coloniile de *S. aureus,* după incubare 18 ore la 37 ^{0}C pe mediu solid au aspect S, sunt cremoase, rotunde, cu diametrul de 2-3 mm, margini perfect regulate, suprafaţa netedă, bombată si lucioasă. Pe AS cu 5% sânge de berbec coloniile au o zona circulară de hemoliză în jur. Prezenţa pigmentului carotenoid, portocaliu sau galben citrin, este o caracteristica a tulpinilor de *S. aureus*, dar si a unor stafilococi coagulazo-negativi (*S. saprophyticus, S. hominis)*. Pigmentogeneza necesită prezenţa oxigenului şi este mai intensă la 20 grade C decât la 37. Nu toate tulpinile de *S. aureus* produc hemolizină sau pigment.

-Testul catalazei:Stafilococii dau testul catalazei pozitiv

-Testul coagulazei: pozitiv

Streptococcus agalactiae

- Examen microscopic: streptococii sunt coci gram pozitivi dispusi in perechi sau in lanţuri scurte.
- Caractere de cultură

Pe AS, dupa 18 ore de incubare aerobă la 37 grade, streptococii de grup B formează colonii înconjurate de o zonă beta-hemoliză incompleta.

- Testul catalazei: negativ.
- Reacţia de latexaglutinare: identificarea antigenică a grupului Lancefield se realizează cu trusa de latex aglutinare si permite identificarea streptococilor beta-hemolitici de grup B.

Enterobacteriaceae

- Examen microscopic: bacili gram negativi
- Caractere de cultură: Fiind nepretenţioase nutritiv, cultivă pe toate mediile de cultură utilizate. Pe AS formează colonii „S” de 2-3 mm, bombate, rotunde, umede, cu suprafaţa netedă şi margini regulate sau colonii „R” , rotunde, plate, cu suprafaţa rugoasă şi margini neregulate. Unele tulpini dezvoltă hemoliză. Pe mediile lichide formele „S” tulbură uniform mediul, iar formele”R” tulbură mediul în grade diferite, cu inel si depozit.
- Caractere biochimice: Se folosesc sistemele multitest: TSI (fermentarea lactozei, glucozei si producerea de hidrogen sulfurat), manita (fermentarea manitei, mobilitate şi producere de urează), se testează producerea de indol, lizin decarboxilază, citrat dehidrogenază si fenilalanildezaminază. Se poate face si identificarea automată pe galerii API.

Pseudomonas aeruginosa

- Examen microscopic: bacili gram negativi fini

- Caractere de cultură: Cultivă pe toate mediile de cultură, la 5-42º C, optim la 37ºC, formand colonii mari, cu luciu metalic, pigmentate în galben-verde sau galben-brun, hemolitice pe AS, ce degajă o aromă asemănătoare florilor de iasomie
- Caractere biochimice: catalaza pozitivă, oxidaza pozitivă, nonfermentativi.

Candida albicans

- Examen microscopic: celule ovale, gram pozitive, unele inmugurite
- Caractere de cultură: pe mediul Sabouraud formează colonii mari, de 2-5 mm diametru, cremoase, albe sau crem, care degajă o aromă de drojdie.
- Testul de filamentare: Se suspensionează câteva colonii de levuri într-o eprubetă ce conţine 0,5 ml ser sanguin. Se agită, se lasă la termostat 2-3 ore, efectuează un preparat lamă- lamelă din suspensia obţinută şi se urmăreşte la microscop apariţia filamentelor. *Candida albicans* dă testul de filamentare pozitiv.

Interpretarea rezultatelor

Este normală prezenţa extracelulară a florei mixte, gram pozitive, gram negative şi a câtorva celule levurice în prelevatele din secreţia uretrală distală. Izolarea de stafilococi coagulazo-negativi, streptococi alfa-hemolitici şi bacili gram negativi în cantitate redusă nu are semnificaţie clinică.

În uretrita specifică gonoreică, în faza incipientă apar numeroase leucocite (PMN) şi numeroşi diplococi gram negativi, intra- şi extracelulari. În faza de vindecare scade numărul leucocitelor şi a gonococilor, cu apariţia celulelor epiteliale şi a florei bacteriene secundare.

În uretritele nespecifice pot fi izolaţi: *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae, Acinetobacter, Candida albicans,* semnificaţia acestora fiind stabilită prin corelarea cu examenul microscopic.

Antibiograma

Se realizează pentru izolatele cu semnificaţie clinică prin metoda difuzimetrică descrisă în procedura „Antibiograma".

5.3.3.B. Prelucrarea secreţiei vaginale

Se pregătesc plăcile cu MC utilizate pentru însămânţare (se scot de la frigider, se usucă suprafaţa lor la termostat şi se notează ID-ul probei pe plăci) şi 2 lamele de microscop curate pentru efectuarea frotiurilor, notându-se cu creionul pe marginea lamei ID-ul probei.

Tamponul pe care s-a prelevat secreţia vaginală şi frotiurile se trimit rapid la laborator, urmând a fi prelucrate.

Frotiurile se colorează :unul cu albastru de metilen sau Giemsa, al doilea se colorează, iar ultimul rămâne de rezervă.

Tamponul 1 se însămânţează prin descărcare şi dispersie pe cate o placă cu AS, Ach, McC si pe o placă cu SabC. Pentru economie se poate folosi câte 1/2 placă din fiecare MC.

Incubarea plăcilor se face 18- 24 ore la 35^0C – 37^0C, uzual aerobă, cu prelungirea incubării până la 48 ore, dacă la 24 ore nu s-au dezvoltat culturi. Placa cu mediul SabC este incubateă 24 ore la 37º şi apoi 7 zile la temperatura camerei.

Examenul microscopic

In preparatul lamă-lamelă se urmăreşte:

- Prezenta unei reacţii inflamatorii când raportul PMN/CES este peste 1. Inflamaţia este intensă in trichomoniază, discretă în candidoză şi de obicei absentă în vaginoză. *Trichomonas vaginalis* este un flagelat piriform, puţin mai mare decât un leucocit, care se depistează în preparatul umed dupa mişcările sacadate, în diferite direcţii, cu 3-4 flageli foarte mobili spre extremitatea voluminoasă, înconjurat de o membrană ondulantă, uşor de recunoscut.

-Prezenta celulelor levurice inmugurite si a pseudohifelor miceliene.

Pe **frotiul colorat cu albastru de metilen sau Giemsa** se evidenţiază:

-Prezenţa reacţiei inflamatorii, tipul şi intensitatea acesteia;

-Prezenţa flagelatului T.vaginalis, a celulelor levurice şi a pseudohifelor şi se observă morfologia bacteriilor.

Frotiul colorat gram permite o apreciere mai exactă a florei vaginale. În condiţii normale aceasta este reprezentată de bacili gram pozitivi lungi, dispuşi izolat, în diplo sau lanţuri scurte şi constituie flora Doderlein. În vaginoze flora normală e înlocuită cu bacili gram variabili (*G. vaginalis. Bacteroides spp) s*au BGN incurbati *(Mobiluncus).*

În vaginitele specifice putem depista:

- *Trichomonas vaginalis* se observă pe preparatul direct, dar şi în frotiul colorat cu albastru de metilen sau Giemsa unde se însoţeşte de o reacţie inflamatorie intensă.

- *Neisseria gonorrhoeae:* se observă prezenţa unei reacţii inflamatorii intense cu PMN integre şi lizate şi prezenţa de diplococi gram negativi intra- si extracelular.

- *Candida albicans:* celule levurice şi pseudohife gram pozitive.

Vaginitele nespecifice sunt date de o varietate de germeni aerobi şi anaerobi, ce fac parte din flora endogenă a vaginului: bacili gram variabili (*G. Vaginalis, Bacteroides spp)*

*s*au BGN incurbaţi *(Mobiluncus).* În vaginoze apar celule vaginale superficiale cu contur mascat de o abundentă flora cocobacilară.

Citirea culturilor

Citirea plăcilor se realizează dupa 24-48 ore şi se urmăreşte dezvoltarea culturilor de microorganisme implicate în etiologia vaginitelor nespecifice: *Neisseria gonorrhoeae* pe Ach, *Streptococcus* grup B pe AS, *Enterobacteriaceae, Acinetobacter* şi *Pseudomonas aeruginosa* pe AS si McC, *Candida* spp pe mediul SabC.

Identificarea

Identificarea izolatelor se face prin : examen microscopic, caractere de cultură, caractere biochimice şi identificare antigenică. Pentru identificare se efectuează frotiu din cultură şi se pot utiliza următoarele teste: catalaza, oxidaza (pozitivă la gonococi şi *Pseudomonas aeruginosa)* , testul coagulazei (pentru stafilococi) , medii multitest TSI, mediul manita cu uree, citrat Simmons pentru *Enterobacteriaceae*, test de filamentare pentru levuri.

Interpretarea rezultatelor

. În vaginitele specifice putem depista: *Trichomonas vaginalis, Neisseria gonorrhoeae* si *Candida albicans*.

Vaginitele nespecifice sunt cauzate de o serie de bacterii existente in flora vaginală normală, care pot invada secundar şi perturba echilibrul florei bacteriene. În ordinea frecvenţei, acestea sunt: *Gardnerella vaginalis,* streptococi beta- hemolitici (mai ales de grup B) , stafilococi, enterobacterii. Semnificaţie au culturile care prezintă aspect monomorf şi ale căror caracteristici coincid cu aspectul morfologic al germenilor din frotiu şi cu prezenta leucocitelor.

Constatarea pe frotiu a unui număr mare de bacili gram negativi, ca şi a unei reacţii citologice, concomitent cu lipsa oricărei culturi pe mediile uzuale aerobe, presupun participarea bacteriilor din grupul *Bacteroides* sau *Fusobacterium*.

Antibiograma

Se realizează pentru izolatele cu semnificaţie clinică prin metoda difuzimetrică descrisă în procedura „Antibiograma”.

Controlul de calitate

Materialele (mediile de cultură, reactivii si coloranţii) utilizate la prelucrarea secreţiilor uretrale si vaginale sunt verificate cu tulpini de referinţă existente in laborator:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Aceste controale se efectuează la fiecare lot de mediu achiziţionat sau turnat în laborator.
Echipamentele sunt verificate (tehnic si metrologic) după un program prestabilit.

5.4. Prezentarea rezultatelor

Examenul microscopic

Se precizează tipul şi intensitatea reacţiei inflamatorii (cu predominanta de PMN sau Lf) şi bacterioscopia: frecvenţa şi caracterele morfotinctoriale ale bacteriilor.
În cazuri urgente, rezultatul se poate comunica telefonic. În scris, rezultatul se comunică in 16-72 ore.
În uretrita gonococică acută rezultatul se comunică sub forma:
„Reactie inflamatorie intensă cu PMN.
Prezenţi diplococi gram negativi intra- si extracelulari."

Culturi

Culturile bacteriene se dezvoltă de obicei în 24-48 ore şi rezultatul se comunică imediat ce se identifică tulpina bacteriană, precizându-se specia identificată. Fungii se dezvoltă dupa 24 ore, culturile fiind urmărite 4 săptămâni. Se comunică rezultatul, precizându-se specia identificată.

5.4.A. Secretia uretrala

Se comunică „Prezenţa/ absenţa" următoarelor microorganisme:

Staphylococcus aureus
Neisseria gonorrhoeaea
Enterobacteriaceae
Candida albicans

5.4.B. Secretia vaginala

Se comunică „Prezenţa/ absenţa" următoarelor microorganisme:

Streptococcus agalactiae
Staphylococcus aureus
Neisseria gonorrhoeaea
Enterobacteriaceae
Candida albicans

Antibiograma (antifungigrama)

Se realizează conform procedurii PSL-M1-08

5.5. Activităţi finale

5.5.1. Validarea

Validarea tehnică a analizelor este realizată de catre operator.
Validarea bioanalitică a rezultatelor este realizată de catre şeful de laborator.

5.5.2. Raportarea rezultatelor

Comunicarea rezultatelor se face:

- în scris prin buletinul de analiză care este trimis medicului curant sau pacientului; buletinul de analiză este semnat si parafat de catre responsabilul de analiză şi managerul tehnic.
- în baza de date a laboratorului şi spitalului;
- rezultatele urgenţelor se pot transmite telefonic medicului curant.

6. RESPONSABILITATI

6.1. Managerul tehnic:

Verifică şi aprobă prin semnătură şi parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01.
Oferă consultanţă beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită.
Execută analizele pentru care este responsabil şi validează rezultatul acestora prin semnătură şi parafă.

6.2. Responsabilul de analiza

Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize de uz intern,cod F-PGL-5.4-1 F.
Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deserveşte compartimentul 01, din registrul de lucru cod RGL-4.4 -0 F şi din registrul de comenzi interne/externe, codRGL-4.4-02I/E şi registrul de comenzi respinse cod RPGL-4.4-02.
Examinează preparatele de microscopie optică şi culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, execută repicările, aglutinările pe lamă şi latex aglutinările, interpretează caracterele exoenzimatice dezvoltate de bacterii şi a aglutinărilor pe lamă, respectiv a latex aglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de laborator şi formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru, cod RGL-4.4-03 F.
Întocmeşte şi tipăreşte buletinul de analiză,cod FGL-5.8-01
Verifică, semnează şi parafează buletinul de analiză FGL-5.8-01 Fşi îl prezintă managerului tehnic spre aprobare.

6.3. Asistentul de laborator

Preia tampoanele cu secretii concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de receptură şi de la asistentul medical de la cabinetul de recoltare.
Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registru de lucru, cod RGL-4.4-03 F.
Transportă mediile de cultură şi sticlăria pregatită pentru utilizare, în compartimentul de lucru şi pregăteşte mediile de cultură pentru însămânţare.
Efectuează însămânţarea produselor biologice pe medii de cultură, pregăteşte preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic.
Transmite buletinul de analiză, cod FGL-5.8-03 F registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltă.

7. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02

- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 F
- Buletinul de analiză FGL-5.8-01

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 F

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICA

EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE

COD: PSL – M1 - 07

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

ELABORAT
Responsabil de analiză
Dr. Olga Filip

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1.SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ
4. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
5.1. CONDIŢII PREALABILE
5.2. RESURSE NECESARE
5.3. CONŢINUTUL PROCEDURII (EXECUŢIA ANALIZEI, ACTIVITĂŢI)
5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
5.5. ACTIVITĂŢI FINALE
6. RESPONSABILITĂŢI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

1. SCOPUL

Această procedură descrie metoda de izolare şi identificare a bacteriilor patogene aerobe dezvoltate la nivel auricular, ocular şi tegumentar în scopul stabilirii diagnosticului etiologic în otite, conjunctivite şi infecții ale tegumentului.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecţioase „Sf. Parascheva" Iaşi.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- MANUALUL CALITATII
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguţ,Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,Bucureşti, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977
- Prospectele truselor de reactivi
-

4.DEFINIŢII SI ABREVIERI

4.1.Definiţii

a. Otitele sunt infecţii ale urechii medii si externe. Otitele medii se manifestă prin durere locală, hipoacuzie, ameţeli, greaţă; timpanul este congestiv şi poate fistuliza cu apariţia unei scurgeri purulente în conductul auditiv extern. Pacienţii cu otite externe au scurgere otică sero-sanguinolentă sau purulentă din conductul auditiv extern.

b. Conjunctivita este inflamaţia conjunctivei oculare, iar keratita inflamaţia corneei. Blefarita înseamnă inflamaţia marginii superioare a pleoapei.

Hordeolum este o infecţie supurativă a glandelor pleoapei cauzată de stafilococi.

c. Puroiul este un exsudat fibrinos, uneori sanguinolent, ce conţine: leucocite (predominant PMN in inflamaţii acute sau mononucleare în inflamaţii cronice specifice) , resturi celulare şi microorganismele determinante.

Semnificaţie clinică

a. Exsudat auricular

Patologia infecţioasă a urechii este dominată de infecţiile conductului auditiv extern şi ale urechii medii.

Urechea medie si internă reprezintă regiuni sterile, dar se pot infecta prin invazia florei locale sau de vecinătate sau în cazul unor boli generale.

Otitele medii, mai frecvente la copii în vârsta de la 3 luni la 3 ani, sunt favorizate de infecţii primare cu virusuri respiratorii sau *Mycoplasma pneumoniae* şi sunt determinate

de: *Streptococcus pneumoniae, S. pyogenes, Haemophilus influenzae, Enterobacteriaceae*, *Moraxella catarrhalis, Staphylococcus aureus* şi bacterii anaerobe.

Otitele externe sunt cauzate de pseudomonade, *Staphylococcus aureus* şi alte bacterii aerobe în condiţii favorizante ca: pătrunderea apei în conductul auditiv extern cu macerarea tegumentului la acest nivel (otita inotătorilor) sau diabetul zaharat (otite externe maligne).

b. Exsudat conjunctival

Infecţiile oculare interesează mai frecvent organele anexe (pleoapele şi conjunctiva) decât globul ocular şi se clasifică în:

- conjunctivite (inflamaţia conjunctivei) şi keratite (inflamaţia corneei), afecţiuni care frecvent se intrică (kerato-conjunctivite);
- endoftalmite determinate de infecţia tunicilor şi umorilor globului ocular;
- infecţii ale pleoapelor: blefarita (inflamaţia marginii libere a pleoapei) , dermatita, hordeolum (infecţia supurativă a glandelor pleoapei);
- infecţii ale aparatului lacrimal: dacriocistite (infecţii ale sacului lacrimal) şi dacrioadenite (infecţii ale glandei lacrimale);
- celulite orbitare.

În infecţiile oculare se pot izola:

- coci gram pozitivi: *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes;*
- coci gram negativi: *Neisseria gonorrhoeae, Moraxella lacunata, Haemophilus influenzae, Acinetobacter calcoaceticus;*
- bacili gram negativi: *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa;*
- bacili gram pozitivi: *Bacillus* spp, *Listeria monocytogenes*;
- chlamidii: *Chlamydia trachomatis*
- fungi: *Candida* spp.

Organismele exogene pot fi introduse în ochi prin intermediul mâinilor , a lentilelor de contact , în cazul unor leziuni sau a unor intervenţii chirurgicale , precum şi prin răspindirea de la ţesuturile vecine. De la alte focare de infecţie apărute în organism se poate realiza propagarea pe cale hematogenă cu localizare oculară.

Cercetarea bacteriologică a secreţiei oculare este practicată în scopul precizării diagnosticului etiologic în afecţiuni ale ochiului .

c. Puroi

Supuraţia reprezintă formarea şi scurgerea de puroi.

Supuraţiile pot afecta orice ţesut sau organ cu acumulare de puroi în:

- interstiţiile cutanate (pustule, furuncule, hidrosadenita, abcese) ;
- în ţesuturi musculo-scheletale (abccese, flegmoane, hidrosadenita, abcese) ;
- în ganglioni limfatici;
- în cavitati preformate (sinusuri paranazale, urechea medie, seroase) , pe suprafeţe denudate (plăgi, arsuri).

Colecţiile purulente se pot deschide spontan prin fistule.

Supuraţiile cutanate sunt determinate de *Staphylococcus aureus* (foliculita, impetigo, furuncule, carbuncule, hidrosadenita), *Streptococcus pyogenes* (impetigo, celulita, erizipel) .

Acneea juvenilă este cauzată de asocierea dintre *Staphylococcus aureus* şi *Propionobacterium acnes*. Unele bacterii determină leziuni specifice ale pielii: *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium*, *Eryzipelothrix*.

Infecţiile subacute sau cronice ale pielii sunt determinate de microorganisme din grupul *Actinomyces-Nocardia* (abcese granulomatoase, celulite profunde) sau *Mycobacterium* (ulcere, gome) .

Infecţiile arsurilor şi plăgilor au etiologii diferite în funcţie de tipul plăgii. Astfel, plăgile traumatice sunt cauzate de: *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella- Enterobacter, Bacteroides, Streptococcus pyogenes.* Plăgile de război sunt determinate de bacterii anaerobe, clostridii, plăgile chirurgicale de bacterii din microbiota regiunii anatomice unde a avut loc intervenţia chirurgicală, frecvent tulpini de spital (*Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella*) , iar plăgile muşcate de animale de *Pasteurella multocida* şi *Streptobacillus moniliformis.*

Adenitele supurate au ca etiologie streptococi piogeni, stafilococi, fungi, *Mycobacterium tuberculosis*, iar abcesele viscerale bacterii anaerobe/facultativ anaerobe, *Entamoeba histolytica.*

4.2. Abrevieri

AS: mediu agar cu 5 % sânge;
Ach: agar chocolat;
McC: agar Mac Conkey;
BCC: bulion cord creier;
SabC: mediul Sabouraud cu cloramfenicol;
PMN: polimorfonucleare neutrofile
H: hematii
L: leucocite
CES: celule epiteliale scuamoase
BGN: bacili gram negativi
BGP: bacili gram pozitivi
CGP: coci gram pozitivi

5. DESCRIEREA PROCEDURII

5.1. Condiţii prealabile

Operatorul care efectuează analiza va purta echipament de protecţie si va respecta normele de protecţia muncii si de lucru specifice laboratorului.

Pregătirea materialelor de laborator

Mediile de cultură, coloranţii se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri şi recipiente şi apoi sunt depozitate în frigider.

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticluţe, flacoane) este pregătită pentru utilizare de către asistentul de laborator.

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură şi sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2- 3 zile şi se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură şi în cutii cu capac eprubetele, sticluţele şi lamele.

5.2. Resurse necesare

Echipamente

-hota cu flux laminar
-termostat
-frigider;
-lampa UV
-microscop optic

Resurse

-anse;
-lame microscop;
-ulei de cedru;
-bec de gaz Bunsen;
-baie colorare;
-cutii Petri;
-tampoane exsudat;
-densimat/scala nefelometrica Mc Farland;
-pense;
-pipete automate;
-pipete sterile;
-varfuri albastre si galbene pentru pipete automate;
-cristalizor/recipiente pentru solutii dezinfectante;
-lame/lamele;
-eprubete sterile de 10/10;
-stative eprubete;
-containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

Reactivi

- medii de cultură: agar cu 5% sânge de berbec, agar chocolat, agar Mac Conkey, agar Sabouraud cu cloramfenicol, eprubete sterile cu bulion cord- creier;
- materiale de control, tulpini de referinţă;
- discuri pentru antibiogramă;
- trusa de coloratie Gram, albastru de metilen şi May- Grunwald- Giemsa;
- ser fiziologic;
- soluţii dezinfectante;
- trusa de identificare grup streptococi;
- trusa de identificare *Staphylococus aureus*
- medii de identificare a bacililor gram negativi (TSI, manita, indol, fenilalanin dezaminaza, citratdehidrogenaza)

Mediile de cultură sunt preparate în laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind insoţit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerinţele specificate (grosime turnat in placă, ph- ul mediului, sterilitatea, etc).

5.3. Conţinutul procedurii

Proba este reprezentată de tamponul cu exsudat auricular/conjunctival/puroi prelevat.

Principiul biologic care stă la baza examinării secretiei auriculare/conjunctivale/ cutanate constă în recoltarea şi cultivarea produsului patologic, izolarea, identificarea agentului patogen şi determinarea sensibilităţii la antibiotice.

5.3.1. Recoltarea

Recoltarea şi transportul la laborator se efectuează conform instrucţiunilor descrise in PO- 06 „ Manualul de recoltare a produselor biologice”.

5.3.1.a. Recoltarea exsudatului auricular se face cu tamponul din conductul auditiv extern în otitele externe. În otitele medii prelevatul de elecţie este exsudatul aspirat prin timpanocenteză, iar în caz de perforaţie spontană a timpanului, se prelevă exsudatul de la nivelul fistulei pe un tampon fin steril.

5.3.1.b. Recoltarea exsudatului conjunctival se face de către specialistul oftalmolog. Se poate preleva: exsudat acumulat în sacul conjunctival, utilizând tampoane umectate cu bulion nutritiv, exsudat sero-purulent aspirat cu micropipeta din sacul conjunctival sau raclat cu spatula de platină sterilă de pe conjunctiva tarsală superioară sau inferioară.

5.3.1.c. Prelevarea puroiului se face diferit în funcţie de localizarea şi de tipul leziunii.

Din leziunile cutanate superficiale închise (vezicule, pustule, flictene) este indicată recoltarea cu ajutorul unei pipete Pasteur sterile sau cu acul unei seringi după antiseptizare cu alcool şi spălarea cu ser fiziologic steril.

Din leziunile cutanate deschise frecvent se face prelevarea cu tamponul steril, tehnica fiind mai puţin precisă, pentru că recoltează şi bacteriile contaminante. Este indicată recoltarea a două tampoane din profunzimea plăgii, prin rotirea fermă a tamponului până apare o uşoară sângerare în ţesutul subiacent; un tampon este utilizat pentru efectuarea frotiurilor, iar celălat pentru însămânţare.

Din ulcerele cutanate cronice se face aspiraţia lichidului interstiţial de sub suprafaţa denudată prin puncţia oblică a ţesutului sănătos de la periferia ulcerului cu un ac hipodermic adaptat la o seringă.

Prelevarea puroiului din colecţii purulente situate în zonele accesibile puncţiei (abcese superficiale) se face prin aspirare cu un ac suficient de gros adaptat unei seringi etanşe.

Pentru a recolta puroiul din fistule sunt indicate spălarea şi antiseptizarea tegumentului, chiuretarea cât mai profundă a traiectului fisulos cu expedierea în laborator a produsului obţinut. Tamponul prelevat de la orificiul fistulei depistează rar adevăratul microb care a determinat supuraţia.

5.3.2. Transportul

Transportul probelor la laborator se face uzual în maxim 2 ore de la prelevare, exceptând unele situaţii speciale.

Probele de puroi trebuie transportate imediat la laborator. Dacă transportul durează mai mult de 2 ore, trebuie utilizat un mediu de transport sau probele trebuie refrigerate. Timpul optim pentru transportul produselor patologice depinde de volumul materialului

obţinut. Volume mici de lichid (<1 ml) trebuie expediate în 15-30 minute pentru a evita evaporarea şi uscarea lor, iar volume mai mari şi probele expediate în mediu de transport pot fi conservate până la 24 ore.

5.3.3. Procesarea produsului biologic

Asistentul care deserveşte compartimentul de microbiologie 1 preia tampoanele cu exsudate auriculare/conjunctivale/puroi şi formularele de solicitare analize de la registratorul medical, apoi le înregistrează în registrul de lucru, notând date de identificare pacient, analiza si numele operatorului.

În registrul de lucru se notează: numărul curent al probei, data, ID pacient, vârsta, diagnosticul, antibioterapia efectuată, denumirea analizei, metoda folosită, numele operatorului şi numele celui care validează analiza.

Etapele examenului microbiologic sunt:

Prelevatul recoltat pe tampon este însămânţat prin descărcare şi dispersie pe plăcile cu medii de cultură indicate pentru fiecare tip de produs, iar apoi tamponul se rulează pe trei lame de microscop curate şi se efectuează frotiuri. Se colorează un frotiu cu albastru de metilen, unul gram, iar al treilea este de rezervă.

5.3.3.1. Examenul microscopic

Exsudatul auricular

Pe frotiul colorat cu albastru de metilen se urmăreşte tipul şi intensitatea reacţiei inflamatorii, iar pe frotiul colorat gram frecvenţa şi caracterele morfotinctoriale ale microorganismelor.

În otitele externe microscopia este fără valoare din cauza contaminanţilor.

În otitele medii se pot observa pe frotiu, alături de celulele inflamatorii, coci gram pozitivi în lanţuri sau grămezi, diplococi gram pozitivi lanceolaţi si capsulaţi, cocobacili gram negativi, bacili gram negativi sau levuri. Asocierea acestora cu celulele inflamatorii orientează asupra diagnosticului etiologic al otitei.

Exsudatul conjunctival

Pe frotiul colorat cu albastru de metilen se urmăreşte tipul şi intensitatea reacţiei inflamatorii: în conjunctivitele bacteriene acute predomină PMN, în timp ce în conjunctivitele bacteriene cronice şi în cele virale predomină limfocitele şi macrofagele.

Frotiul colorat gram oferă informaţii despre frecvenţa şi caracterele morfotinctoriale ale microorganismelor implicate. Se pot observa diplococi gram negativi, cocobacili gram negativi, diplococi gram pozitivi lanceolaţi sau rotunzi, levuri.

Puroiul

Pentru puroiul prelevat in seringă se poate face examenul macroscopic. Se urmăreşte:

- consistenţa: cremos in infecţii stafilococice, lichid în infecţii streptococice şi cazeos în infecţia tuberculoasă;
- culoarea: variază de obicei de la galben la rosu- brun; este albastru verzui în infecţia cu *Pseudomonas aeruginosa* şi verzui în infecţia pneumococică;

- mirosul fetid, fecaloid apare in supuraţii determinate de bacterii anaerobe.

Examenul microscopic se bazează pe examinarea frotiului colorat gram.

Efectuarea frotiului din probele recoltate prin aspiraţie cu seringa sau pipeta se face prin depunerea unei picaturi de puroi pe pe suprafaţa a două lame curate şi întinderea picăturii cu ajutorul ansei până se obţine un frotiu subţire si uniform. Dacă puroiul a fost recoltat pe 2 tampoane, unul se rulează pe suprafaţa unei lame sterilizate prin flambare şi răcire, obţinându-se un frotiu subţire si uniform. Frotiurile se usucă la temperatura camerei sau pe lampa de platină şi se fixează prin căldură. Un frotiu se colorează gram.

Examinarea frotiului gram din plăgi sau abcese este foarte importantă, pentru că oferă o identificare rapidă prezumtivă a etiologiei, poate fi folosit pentru a evalua calitatea probelor primite si ghidează interpretarea rezultatelor culturii. Calitatea probelor din plăgi poate fi evaluată prin compararea numarului de PMN si CES. Prezenţa în exces a CES sugerează o contaminare cu floră cutanată. Frotiul colorat gram oferă informaţii referitoare la citologie si bacterioscopie.

Leucocitele apar ca celule inflamatorii rotunde, putând fi diferenţiate pe frotiurile bine colorate in PMN, Lf si Mf.

Bacterioscopia se referă la caracterele morfotinctoriale ale bacteriilor şi oferă o apreciere semicantitativă a microbilor observaţi: foarte rari (1/50-100 campuri), rari (1/10-20 campuri), numeroşi (1-10/câmp) şi foarte numeroşi (zeci-sute/ camp). În infecţiile mixte cu bacterii anaerobe există bacterii foarte numeroase si polimorfe, ce includ streptococi, bacili gram negativi fini, bacili gram pozitivi subtiri şi slab coloraţi şi bacili gram pozitivi mari sugerând *Clostridium* spp.

Puroiul micetoamelor este format dintr-o masă de filamente subţiri, cu diametrul de 0,5-1 micron, gram pozitive şi se poate fragmenta în forme cocoide şi bacilare difteroide. Pseudohifele nocardiilor apar colorate neuniform gram pozitiv. Diferenţa microscopică a nocardiilor de actinomicete se face prin acido- rezistenţă parţială.

Frotiul colorat Ziehl-Neelsen se face la cererea clinicianului sau când bacterioscopia este negativă pe frotiul colorat gram din exsudatele purulente pleurale, articulare, ganglionare sau osoase şi se suspectează etiologia tuberculoasă. De asemenea, se indică şi la examinarea raclajelor din leziunile cutanate nodulare ale înotătorilor şi pescarilor, ce pot fi determinate de *Mycobacterium marinum*.

Coloratia Ziehl-Neelsen modificată, cu decolorare scurtă este utilizată pentru a diferenţia nocardiile de actinomicete. Pseudohifele nocardiilor variază de la acido-rezistenţa parţială la acido- rezistenţa completă, iar restul actinomicetelor sunt neacido-rezistente.

5.3.3.2. Cultivarea

Exsudatul auricular

Mediile de cultură folosite pentru însămânţarea exsudatului auricular sunt:

- AS-agar Columbia sau agar nutritiv cu 5% sânge de berbec;
- Ach-agar chocolat;
- McC sau alt mediu selectiv lactozat;
- BCC pentru exsudatul otic recoltat prin timpanocenteza;
- Mediul Sabouraud cu cloramfenicol se poate utiliza la cererea clinicianului, când există suspiciunea etiologiei fungice a otitei.

Uzual, tamponul cu secreţie otică se însămânţează pe o placă cu Ach, o placă cu AS şi una cu agar McC (se rulează tamponul pe un cadran al unei plăci cu diametrul de 9 mm şi apoi se face dispersia în patru cadrane).

Incubarea se face timp de 24-48 ore în atmosfera cu 5% CO2 placa cu Ach şi în atmosfera aerobă plăcile cu AS, McC sau alte medii folosite.

Citirea plăcilor se realizează dupa 24-48 ore şi se urmăreşte dezvoltarea culturilor de: *Haemophilus influenzae* pe mediul Ach, *Streptococcus pneumoniae pe AS sau* Ach*, Staphylococcus aureus* pe AS, *Enterobacteriaceae, Acinetobacter* spp si *Pseudomonas aeruginosa* pe AS si McC, *Candida* spp, *Cryptococcus* sau *Aspergillus* pe mediul SabC.

Exsudatul conjunctival

Mediile de cultură folosite pentru însămânţarea exsudatului conjunctival sunt:

- AS- agar Columbia sau agar nutritiv cu 5% sânge de berbec;
- Ach- agar chocolat;
- McC sau alt mediu selectiv lactozat;
- Mediul Sabouraud cu cloramfenicol se poate utiliza la cererea clinicianului, când există suspiciunea etiologiei fungice a conjunctivitei.

Uzual, tamponul cu secreţie conjunctivală se însămânţează pe o placă cu Ach, o placă cu AS şi una cu agar McC (se rulează tamponul pe un cadran al unei plăci cu diametrul de 9 mm şi apoi se face dispersia în patru cadrane).

Incubarea se face timp de 24-48 ore în atmosfera cu 5% CO2 placa cu Ach şi în atmosfera aerobă plăcile cu AS, McC sau alte medii folosite.

Citirea plăcilor se realizează după 24-48 ore şi se urmăreşte dezvoltarea culturilor de: *Haemophilus influenzae* pe mediul Ach, *Neisseria meningitidis* si *N. gonorrhoeae* pe Ach, *Streptococcus pneumoniae pe AS* sau Ach*, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Moraxella lacunata* pe AS, *Enterobacteriaceae, Acinetobacter calcoaceticus* şi *Pseudomonas aeruginosa* pe AS si McC, *Candida* spp pe mediul SabC.

Puroiul

Mediile de cultură însămânţate, condiţiile şi durata de incubare sunt în funcţie de conjunctura clinico- epidemiologică, rezultatele microscopiei şi caracterele leziunilor supurative examinate.

Pentru izolarea bacteriilor aerobe şi facultativ anaerobe cu creştere rapidă din puroi, se însămânţează produsul recoltat pe tampon pe:

- o placă cu AS;
- o placă cu agar McC sau alt mediu cu selectivitate joasă pentru bacili gram negativi.

Probele necontaminate aspirate din cavităţi închise se însămânţează şi pe un tub cu bulion cord- creier şi unul cu bulion Schadler.

Incubarea se face 24-48 ore la 37º C în atmosferă aerobă pentru mediile solide şi timp de 5 zile la 37º C pentru mediile lichide.

Probele de puroi articular se însămânţează suplimentar şi pe o placă cu Ach, incubarea făcându-se la 37º C în atmosfera cu CO2, timp de 24-48 ore până la 5 zile pentru urmărirea neisseriilor şi a culturii in bulion.

Pentru izolarea fungilor se însămânţează produsul pe o placă cu mediul SabC şi se incubează la 37º C pentru izolarea formelor tisulare ale fungilor dimorfi şi la 30 grade pentru izolarea fungilor filamentoşi, culturile urmărindu-se timp de 30 zile.

5.3.3.3. Identificarea izolatelor se face prin:

- Examen microscopic;
- Caractere de cultură;
- Caractere biochimice;
- Caractere antigenice.

- pentru identificare se efectuează frotiu din cultură şi se pot utiliza următoarele teste: catalaza, oxidaza (pozitivă la gonococi şi *Pseudomonas aeruginosa)* , testul coagulazei (pentru stafilococi) , test de filamentare pentru levuri. Se poate face identificare automată pe galerie API.

Neisseria meningitidis

- Examen microscopic: diplococi gram negativi, cu diametrul de 0,6-1 mm, feţele adiacente reniforme sau aplatizate (în boabe de cafea);
- Caractere de cultură: pe Ach sau AS, dupa 24-48 ore incubare în atmosferă de CO2 la 37º C, formează colonii S transparente, de 1-2 mm diametru, rotunde, cu margini regulate, netede, lucioase;
- Caractere biochimice: testul oxidazei pozitiv.

Streptococcus pneumoniae

- Examen microscopic: coci gram pozitivi, lanceolaţi, frecvent capsulaţi, dispuşi în diplo şi în scurte lanţuri;
- Caractere de cultură: pe AS formează colonii gri- opace, alfa- hemolitice, cu diametrul de ~1 mm, care pot autoliza în câteva ore, devenind crateriforme. Tulpinile capsulate formează colonii transparente mucoide. Pe mediile lichide pneumococii cresc, tulburând omogen mediul.
- Testul de sensibilitate la optochin diferenţiază prezumtiv streptococii alfa-hemolitici în pneumococi, sensibili (diametrul zonei de inhibiţie > 14 mm) şi streptococi viridans, rezistenţi.

Streptococi beta hemolitici

-Examen microscopic: coci gram pozitivi dispusi in perechi sau in lanţuri scurte.

-Caractere de cultura: pe AS, dupa 18 ore de incubare aerobă la 37 grade, streptococii de grup A, C sau G formează colonii mici (0,5-1 mm diametru), transparente sau opace, înconjurate de o zonă largă de beta-hemoliză.

-Caractere biochimice:Testul catalazei negativ

-Testul de sensibilitate la bacitracină : diferenţierea streptococilor beta-hemolitici se face prezumtiv prin testul la bacitracină în: streptococi de grup A (sensibili in proportie de 99%) si non-grup A (rezistenti in proportie de 97%).

-Reacţia de latexaglutinare: Identificarea antigenică a grupului Lancefield se realizează cu trusa de latex aglutinare si permite identificarea streptococilor beta-hemolitici non grup A (grup C sau G).

Staphylococcus aureus

- Examen microscopic: stafilococii apar sub formă de coci rotunzi, dispuşi in grămezi neregulate, asemănătoare ciorchinelor de strugure.

-Caracteree de cultură: Obişnuit, coloniile de *S. aureus,* după incubare 18 ore la 37 ^{0}C pe mediu solid au aspect S, sunt cremoase, rotunde, cu diametrul de 2-3 mm, margini perfect regulate, suprafaţa netedă, bombată si lucioasă. Pe AS cu 5% sânge de berbec coloniile au o zona circulară de hemoliză în jur. Prezenţa pigmentului carotenoid, portocaliu sau galben citrin, este o caracteristica a tulpinilor de *S. aureus*, dar si a unor stafilococi coagulazo-negativi (*S. saprophyticus, S. hominis)*. Pigmentogeneza necesită prezenţa oxigenului şi este mai intensă la 20 grade C decât la 37. Nu toate tulpinile de *S. aureus* produc hemolizină sau pigment.

-Testul catalazei:Stafilococii dau testul catalazei pozitiv

-Testul coagulazei: pozitiv

Haemophilus influenzae

- Examen microscopic: cocobacili gram negativi polimorfi;
- Caractere de cultură: pe Ach, în atmosferă cu CO2, formează colonii gri- lucioase sau semiopace, netede, plane sau convexe, cu margini precise şi diametrul de 1-2 mm, rotunde, convexe, transparente sau albastru-verzui.

Enterobacteriaceae

- Examen microscopic: bacili gram negativi
- Caractere de cultură: Fiind nepretenţioase nutritiv, cultivă pe toate mediile de cultură utilizate. Pe AS formează colonii „S" de 2-3 mm, bombate, rotunde, umede, cu suprafaţa netedă şi margini regulate sau colonii „R" , rotunde, plate, cu suprafaţa rugoasă şi margini neregulate. Unele tulpini dezvoltă hemoliză. Pe mediile lichide formele „S" tulbură uniform mediul, iar formele"R" tulbură mediul în grade diferite, cu inel si depozit.
- Caractere biochimice: Se folosesc sistemele multitest: TSI (fermentarea lactozei, glucozei si producerea de hidrogen sulfurat), manita (fermentarea manitei, mobilitate şi producere de urează), se testează producerea de indol, lizin decarboxilază, citrat dehidrogenază si fenilalanildezaminază. Se poate face si identificarea automată pe galerii API.

Pseudomonas aeruginosa

- Examen microscopic: bacili gram negativi fini
- Caractere de cultură: Cultivă pe toate mediile de cultură, la 5-42º C, optim la 37ºC, formand colonii mari, cu luciu metalic, pigmentate în galben-verde sau galben-brun, hemolitice pe AS, ce degajă o aromă asemănătoare florilor de iasomie
- Caractere biochimice: catalaza pozitivă, oxidaza pozitivă, nonfermentativi.

Candida albicans

- Examen microscopic: celule ovale, gram pozitive, unele inmugurite
- Caractere de cultură: pe mediul Sabouraud formează colonii mari, de 2-5 mm diametru, cremoase, albe sau crem, care degajă o aromă de drojdie.
- Testul de filamentare: Se suspensionează câteva colonii de levuri într-o eprubetă ce conţine 0,5 ml ser sanguin. Se agită, se lasă la termostat 2-3 ore, efectuează un preparat lamă- lamelă din suspensia obţinută şi se urmăreşte la microscop apariţia filamentelor. *Candida albicans* dă testul de filamentare pozitiv.

Cryptococcus neoformans

- Examen microscopic: celule sferice, cu dimensiuni variabile de la 2 la 15 microni, izolate sau înmugurite, de obicei capsulate.
- Caractere de cultură: Pe mediul Sabouraud formează după incubare 24-48 ore la 37 grade colonii albe, cremoase.
- Testul ureazei pozitiv.
- Identificarea definitivă se realizeaza folosind o galerie de identificare API Candida.

5.3.3.4. Antibiograma (antifungigrama)

Se realizează conform procedurii PSL-M1-08

5.3.3.5. Controlul de calitate

Materialele (mediile de cultură, reactivii si coloranţii) utilizate la prelucrarea exsudatului auricular, conjunctival si a puroiului sunt verificate cu tulpini de referinţă existente in laborator:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Aceste controale se efectuează la fiecare lot de mediu achiziţionat sau turnat în laborator.

Echipamentele sunt verificate (tehnic si metrologic) după un program prestabilit.

Colectarea si distrugerea deseurilor

Se realizează conform instrucţiunilor de lucru, cod IL- Ed.1, Rev.0/ „Colectarea, depozitarea si transportul deşeurilor”.

5.4. Prezentarea rezultatelor

5.4.1. Interpretarea rezultatelor

Pentru identificarea microorganismului patogen se face corelarea caracterelor microscopice, de cultură, biochimice si antigenice.

Exsudatul auricular

În otitele medii, izolarea de *Streptococcus pneumoniae*, *S.pyogenes*, *Haemophilus influenzae, Enterobacteriaceae, Staphylococcus aureus,* în contextul reacţiei inflamatorii şi a bacterioscopiei pozitive la examenul direct, are semnificaţie clinică.

Otitele externe sunt asemănătoare infecţiilor tegumentului, izolându-se mai frecvent pseudomonade şi *Staphylococcus aureus*. Interpretarea culturilor trebuie facută atent, pentru ca bacteria infectantă poate fi dominată de contaminanţi din conductul auditiv extern, ca stafilococii coagulazo negativi şi bacilii difterimorfi.

Exsudatul conjunctival

În secreţia conjunctivală normală apar la examenul microscopic celule descuamate integre sau pe cale de liză, rare PMN şi Mf şi flora microbiană polimorfă: coci, bacili difterimorfi, ocazional levuri. Argumente pentru semnificaţia clinică a unor microorganisme condiţionat patogene sunt: izolarea monomicrobiană sau prezenţa unui izolat predominant şi în cantitate mare în contextul inflamaţiei de pe frotiul direct.

Monomorfismul bacterian asociat reacţiei inflamatorii sugerează infecţia. De exemplu, în conjunctivita gonococica se constată la examenul microscopic diplococi gram negativi asociati reacţiei cu PMN; acelaşi aspect microscopic apare în infecţia cu *Moraxella lacunata, Acinetobacter calcoaceticus* şi *Neisseria meningitidis*. Pentru a stabili cu precizie etiologia, se urmăreşte creşterea pe mediile de cultură însămânţate. Dacă s-au dezvoltat culturi pe AS, se urmăresc criteriile microscopice şi biochimice de identificare ale bacteriilor *Moraxella lacunata si Neisseria meningitidis.* Infecţia cu *Acinetobacter calcoaceticus* este indicată de dezvoltarea culturii pe AS şi McC.

Prezenţa cocobacililor gram negativi pe frotiul gram şi dezvoltarea pe Ach, în atmosfera cu CO2, de colonii gri- lucioase sau semiopace, netede, plane sau convexe, cu margini precise şi diametrul de 1-2 mm, rotunde, convexe, transparente sau albastru-verzui indică infecţia cu Haemophilus.

Infectia cu *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes* si *Staphylococcus aureus* este sugerată de prezenţa cocilor gram pozitivi la examenul microscopic şi dezvoltarea culturilor caracteristice pe AS.

Observarea bacilior gram negativi la examenul microscopic şi pozitivarea culturilor pe toate mediile, orientează spre infecţia cu *Enterobacteriaceae* sau *Pseudomonas aeeruginosa,* diagnosticul diferenţial fiind uşor de realizat prin caracterele de cultură şi testul oxidazei.

Numeroase levuri şi filamente constatate la examenul microscopic şi dezvoltarea culturilor pe mediul SabC indică conjunctivita fungică.

Puroiul

O tulpină microbiană izolată dintr-o supuraţie superficială are semnificaţie clinică dacă:

- există corelatie intre bacterioscopie si cultură;
- există contextul clinic;
- se izolează repetat o bacterie condiţionat patogenă în prelevate succesive (e.g. *Staphylococcus epidermidis*).

O tulpina microbiană izolată într-o supuraţie este considerată contaminant, dacă la examenul microscopic apar multe CES , rare celule inflamatorii, floră microbiană variată, microorganismul este saprofit, condiţionat sau accidental patogen, creşte pe mediile de cultură asociat de obicei altor microorganisme.

În plăgi şi arsuri, streptococii beta hemolitici au semnificaţie clinică indiferent de cantitatea în care se dezvoltă.

Dacă s-au dezvoltat culturi pe toate mediile uzuale însămânţate, bacteriile izolate sunt nepretenţioase nutritiv şi aparţin familiei *Enterobacteriaceae* sau genurilor *Acinetobacter* sau *Pseudomonas,* identificarea lor făcându-se prin teste biochimice.

În cazul dezvoltării culturii numai pe AS şi pe medii lichide, se fac teste de diferenţiere şi identificare de: streptococi, pneumococi, entrococi, stafilococi, Haemophilus, Moraxella.

Dacă pe mediile de cultură utilizate nu s-au dezvoltat bacterii, dar examenul microscopic arată prezenţa a numeroase PMN şi a multe bacterii: BGN fini şi BGP, este posibilă infecţia cu o bacterie anaerobă.

5.4.2. Comunicarea rezultatelor

5.4.2.1. Examenul microscopic

Se precizează tipul şi intensitatea reacţiei inflamatorii (cu predominanţa de PMN sau Lf) şi bacterioscopia: frecvenţa şi caracterele morfotinctoriale ale bacteriilor.

În cazuri urgente, rezultatul se poate comunica telefonic. În scris, rezultatul se comunică in 16-72 ore.

Exsudatul auricular

În buletinul de analiză la examenul microscopic se comunică intensitatea reacţiei inflamatorii şi categoria morfotinctorială asociată reacţiei inflamatorii. Astfel, dacă reacţiei inflamatorii cu PMN, se asociază diplococi gram pozitivi capsulaţi, se specifică:

“Reacţie inflamatorie intensă cu PMN. Prezenţi diplococi gram pozitivi lanceolaţi şi capsulaţi”.

Dacă produsul patologic nu este de calitate, predominând CES şi flora microbiană variată, se comunică: “Reacţie inflamatorie redusă, numeroase celule epiteliale scuamoase. Prezenţi coci gram pozitivi şi bacili difterimorfi”.

Exsudatul conjunctival

Se notează reacţia inflamatorie: absentă sau prezentă, apreciindu- se intensitatea ei şi tipul celulelor inflamatorii care predomină. Daca există celule epiteliale, se semnalează prezenţa acestora, fiind un marker al contaminării probei. Se comunică rezultatul bacterioscopiei: negativă daca nu se observă bacterii sau levuri la examenul direct, iar dacă apar bacterii, se semnalează frecvenţa lor şi caracterele morfotinctoriale.

Exemple:

”Reacţie inflamatorie intensă cu predominanţa PMN. Numeroşi cocobacili gram negativi”.

“Reacţie inflamatorie redusă. Bacterioscopie negativă”.

Puroiul

În prima etapă se comunică rezultatul examenului frotiului colorat gram, care oferă informaţii despre calitatea produsului şi posibila etiologie a infecţiei.

Comunicarea unui rezultat sub forma: “Reacţie inflamatorie redusă/ absentă, numeroase celule epiteliale. Prezenţi numeroşi coci gram pozitivi şi bacili difterimorfi” semnalează o contaminare cu flora cutanată, solicitând clinicianului o nouă probă, dacă recoltarea este posibilă.

Dacă proba a fost recoltată corect, se menţioneaza tipul şi intensitatea reacţiei inflamatorii, categoria microscopică şi aprecierea semicantitativă a microbilor observaţi.

E.g.: “Reacţie inflamatorie intensă cu PMN. Numeroşi bacili gram negativi.”

Rezultatul examinării microscopice a frotiului colorat Ziehl-Neelsen se exprimă astfel:

“Prezenţi/ Absenţi bacili acido- alcoolo- rezistenţi”.

5.4.2.2. Cultura

Culturile bacteriene se dezvoltă de obicei în 24-48 ore şi rezultatul se comunică imediat ce se identifică tulpina bacteriană, precizându-se specia identificată. Micobacteriile cresc mai lent, după 2-3 săptămâni de incubare, rezultatul comunicându-se în momentul în care se obţine cultura pozitivă („prezent *Mycobacterium* spp").

Fungii se dezvoltă dupa 24 ore, culturile fiind urmărite 4 săptămâni. Se comunică rezultatul, precizându-se specia identificată (e.g. "Prezent *Cryptococcus neoformans*"sau „Prezent *Candida* spp").

În cazul în care se izolează o specie bacteriană sau un fung, se comunică denumirea microorganismelor identificate si considerate a avea semnificatie clinica.

În situaţia în care culturile sunt negative, se consemnează în buletinul de analiză:" absenta microorganismelor (specie, gen) ce pot fi izolate in produsul prelucrat.

Exsudatul auricular

Rezultatul culturii se comunică la 24- 48 ore de la recepţia produsului, menţionându-se in buletinul de analiză specia sau genul microorganismelor izolate.

Dacă nu s-au dezvoltat culturi după epuizarea perioadei de incubare comunicăm in BA: absenţa microorganismelor (specie, gen) ce pot fi izolate in produsul prelucrat:

„Absent *Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp, Enterobacteriaceae, Moraxella catarrhalis, Candida albicans".*

Dezvoltarea pe mediile de cultură a mai multor tipuri de bacterii ce fac aparţin florei normale a tegumentului şi prezenţa celulelor epiteliale în cantitate mare la examenul microscopic se semnalează in BA: „Floră de contaminare tegumentară".

Exsudatul conjunctival

Dacă se izolează: un patogen sau un condiţionat patogen predominant, în cantitate mare şi asociat reacţiei inflamatorii pe frotiul direct se precizează denumirea speciei bacteriene izolate. In cazul in care nu s-au izolat microorganisme cu semnificatie clinica in exsudat, se consemneaza in BA absenta acestora:

„Absent *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp, Enterobacteriaceae, Moraxella spp , Candida albicans".*

Izolarea de stafilococi coagulazo negativi, bacili difterimorfi, corelată cu prezenţa celulelor epiteliale la microscopia directă, se comunică sub forma: „Floră de contaminare tegumentară".

Puroiul

Rezultatele culturii se comunică la 24- 48 ore de la recepţia probei.

Se comunică denumirea microorganismelor identificate şi considerate a avea semnificaţie clinică. Astfel, dacă în cultura se izolează în cantitate mare *Pseudomonas aeruginosa*, rezultatul este: "Prezent *Pseudomonas aeruginosa*".

În cazul în care culturile au fost negative se comunica in BA: "Absent *Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp, Enterobacteriaceae, Candida albicans".*

5.4.2.3. Antibiograma (antifungigrama)

Antibiograma se realizează prin metoda difuzimetrică sau pe galerie API conform procedurii PSL-M1-08

În infecţiile fungice se face antifungigrama pe galerii API (Fungus 3), rezultatul comunicându-se la 24-48 ore după izolarea şi identificarea fungului.

În cazul exsudatului conjunctival, in antibiograma se testează antibioticele incluse în coliruri oftalmice: penicilina, gentamicina, neomicina, tetracicline, macrolide, cloramfenicol, rifampicina, polimixine, bacitracina.

5.5. Activităţi finale

5.5.1. Validarea

Validarea tehnică a analizelor este realizată de catre operator.
Validarea bioanalitică a rezultatelor este realizată de catre şeful de laborator.

5.5.2. Raportarea rezultatelor

Comunicarea rezultatelor se face:
- în scris prin buletinul de analiză care este trimis medicului curant sau pacientului; buletinul de analiză este semnat si parafat de catre responsabilul de analiză şi managerul tehnic.
- în baza de date a laboratorului şi spitalului;
- rezultatele urgenţelor se pot transmite telefonic medicului curant.

6. RESPONSABILITATI

6.1. Managerul tehnic

Verifică şi aprobă prin semnătură şi parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8 011C.

Oferă consultanţă beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită.

Execută analizele pentru care este responsabil şi validează rezultatul acestora prin semnătură şi parafă.

6.2. Responsabilul de analiza

Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize de uz intern, cod F-PGL-5.4. 1C sau F-PGL-5.4.-1G.

Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deserveşte compartimentul 01, din registrul de lucru cod R-PGL-4.4-01 C sau R-PGL-4.4-01 G şi din registrul de comenzi interne/ externe şi registrul de comenzi respinse.

Examinează preparatele de microscopie optică şi culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, execută repicările, aglutinările pe lamă şi latex aglutinările, interpretează caracterele exoenzimatice dezvoltate de bacterii şi aglutinările pe lamă, respectiv a latex aglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de laborator şi formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru.

Întocmeşte şi tipăreşte buletinul de analiză FGL-5.8-01.

Verifică, semnează şi parafează buletinul de analiză FGL-5.8-01.

6.3. Asistentul de laborator

Preia tampoanele cu exsudate sau secretii concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de receptură şi de la asistentul medical de la cabinetul de recoltare.

Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registru de lucru.

Transportă mediile de cultură şi sticlăria pregatită pentru utilizare, în compartimentul de lucru şi pregăteşte mediile de cultură pentru însămânţare.

Efectuează însămânţarea produselor biologice pe medii de cultură, pregăteşte preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic.

Transmite buletinul de analiză registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltă.

7. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02
- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 G
- Buletinul de analiză F-PGL-5.8-01

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 G

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICĂ

ANTIBIOGRAMA

COD: PSL – M1 - 08

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

ELABORAT
Dr. Olga Filip

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1.SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ
4. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
5.1. CONDIŢII PREALABILE
5.2. RESURSE NECESARE
5.3. CONŢINUTUL PROCEDURII (EXECUŢIA ANALIZEI, ACTIVITĂŢI)
5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
5.5. ACTIVITĂŢI FINALE
6. RESPONSABILITĂŢI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

1. SCOPUL

Procedura descrie metoda de determinare a sensibilităţii bacteriilor la antibiotice prin tehnica difuzimetrică standardizată Kirby-Bauer.

Laboratorul clinic asistă medicul clinician la iniţierea, ţintirea şi monitorizarea tratamentului antimicrobian. Arsenalul terapeutic antimicrobian este diferit în funcţie de categria agenţilor infecţioşi: bacterii, fungi, protozoare sau virusuri.

Antibiograma difuzimetrică este metoda uzuală pentru laboratoare care testează un număr mic de tulpini bacteriene cu creştere rapidă (creştere peste noapte la 35- 37º C): enterobacteriacee, pseudomonade şi alţi bacili gram negativi nonfermentativi, stafilococi, streptococi, enterococi, specii de *Neisseria* sau *Haemophilus*. Este necesară pentru ghidarea tratmentului în infecţii diverse, fiind foarte utilă clinicianului.

Se poate realiza şi în scop epidemiologic, pentru urmărirea emergenţei tulpinilor rezistente la medicamentele de elecţie şi de rezervă şi pentru supravegherea spectrului de antibiotip.

Testarea activităţii in vitro a antibioticelor urmăreşte orientarea în alegerea terapiei adecvate pentru un pacient .

Relaţia in vitro, microorganism – antibiotic se defineşte prin concentraţia minimă inhibitorie (CMI) .

CMI este cea mai mică concentraţie de antibiotic care inhibă multiplicarea bacteriilor . O tulpină este sensibilă când CMI a antibioticului este de minimum 2-4 ori mai mică decât concentraţia serică obţinută după administrarea unor doze utilizabile in terapie .

O tulpină este intermediară sau moderat sensibilă cand CMI este apropiat de nivelul seric . Efectul terapeutic se obţine cu doze mari (pe cale generală, cand antibioticul este netoxic) sau printr-o concentrare în focarul infecţios (exemplu: urină).

O tulpină este rezistentă când CMI a antibioticului este mai mare decât nivelul seric.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecţioase „Sf. Parascheva” Iaşi.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- MANUALUL CALITATII
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguţ, Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,Bucureşti, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977
- Standardul CLSI 2013

4.DEFINITII SI ABREVIERI

4.1.Definiţii

Antibiograma reprezintă metoda de laborator prin care se determină gradul de sensibilitate la diverse antibiotice a unei tulpini bacteriene.

Antibiotic- substanţă de origine biologică, semisintetică sau sintetică, ce prezintă activitate selectivă împotriva bacteriilor şi este potenţial utilizabil în tratamentul infecţiilor.

Sensibilitatea microbiologică se referă la populaţiile bacteriene cărora le lipsesc mecanismele de rezistenţă (populatia bazală sau sensibilă).

Rezistenţa microbiologică defineşte microorganismele ce posedă orice mecanism de rezistenţă demonstrată fenotipic sau genotipic. Rezistenţa poate fi de nivel jos sau înalt (e asociată cu lipsa sinergiei între beta-lactamine şi aminoglicozide pentru enterococi).

Intermediar sensibilă este o bacterie ce aparţine grupului de tulpini ce se situează între tulpinile clinic sensibile si clinic rezistente.

Rezistenţa incrucişată este absenţa parţial sau completă a sensibilităţii la un grup de antibiotice.

Citire interpretativă a datelor de sensibilitate înseamnă deducţia mecanismelor biochimice de rezistenţă sau a interferenţei sensibilităţii sau rezistenţei clinice pe baza fenotipului observat.

Spectru de sensibilitate reprezintă profilul activităţii unui agent antimicrobian asupra unor variate specii bacteriene sau grupuri de specii (e.g. gram pozitivi sau gram negativi).

Puncte de ruptură sunt valori specifice ale unor parametri cum sunt concentraţiile minime inhibitorii sau zonele de inhibiţie.

CMI reprezintă cea mai joasă concentraţie (exprimată in mg/L care, în condiţii definite, previne creşterea bacteriană într-o perioadă de timp definită).

CMB este cea mai mică concentraţie de antibiotic (exprimată in mg/l), care în condiţii definite în vitro scade cu 99,9% numărul de microorganisme dintr-un mediu conţinând un număr definit de microorganisme într-un interval definit de timp.

Toleranţa apare atunci când, în condiţii bine definite, o substanţă care are de obicei efect bactericid asupra bacteriei testate prezintă un efect bactericid scăzut sau absent, fără scăderea CMI. Toleranţa transformă un agent bactericid într-unul bacteriostatic.

Tulpini de referinţă sunt bacterii catalogate, cu fenotipuri de sensibilitate la antibiotice stabile, definite şi sunt utilizate pentru controale de calitate.

Inoculul este reprezentat de numărul de bacterii dintr-o suspensie, calculat prin raportare la volumul final şi se exprimă in UFC/ ml.

Zona de inhibiţie este aria lipsită de creşterea bacteriană sub forma de strat de creştere, care rezultă în urma efectului inhibitor al antibioticului care a difuzat în mediu din sursa aplicată. Diametrul zonei de inhibiţie este exprimat in mm.

Profilul de sensibilitate la antibiotice al unei specii bacteriene este suma antibioticelor faţă de care sunt sensibile majoritatea sau toate tulpinile unui lot reprezentativ testat.

4.2. Abrevieri

MH- mediu Muller Hinton;
HS- mediu Muller Hinton sânge;
SF- ser fiziogic;

ATCC- American Type Culture Collection;
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute;
NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards;
NCTC - National Collection of Type Culture;
S- sensibil;
I- intermediar;
R- rezistent;
CMI- concentratia minima inhibitorie;
mg/l- miligram/ litru ;
BA- buletin de analiză;
BLSE- beta- lactamaze cu spectru extins

5. DESCRIEREA PROCEDURII

5.1. Condiţii prealabile

Operatorul care efectuează analiza va purta echipament de protecţie si va respecta normele de protecţia muncii si de lucru specifice laboratorului.

Pregătirea materialelor de laborator

Mediile de cultură,coloranţii se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri şi recipiente şi apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice.

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticluţe, flacoane) este pregatită pentru utilizare de către asistentul de laborator.

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură şi sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2- 3 zile şi se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură şi în cutii cu capac eprubetele, sticluţele şi lamele.

5.2. Resurse necesare

Echipamente

- hota cu flux laminar
- termostat
- frigider;
- lampa UV

1.9. REACTIVI SI ALTE SUBSTANŢE

- medii de cultură: plăci cu agar Mueller Hinton sau Hinton sânge turnat în strat uniform de 4 mm grosime (25 ml mediu per placă cu diametrul de 9 mm);
- materiale de control, tulpini de referinţă;
- trusa cu discuri antimicrobiene comercializate de diferite firme (păstrate la 4-8º C, cu exceptia beta- lactaminelor ce se păstrează la -15º C);
- ser fiziologic;
- soluţii dezinfectante;
- rigla sau subler
- tulpini de referinţă.

Mediile de cultură sunt preparate în laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind insoţit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerinţele specificate (grosime turnat in placă, ph- ul mediului, sterilitatea, etc). Pentru controlul sterilitatii, o placa din lot este incubata 24 ore la 37 grade C.

Resurse

- anse;
- bec de gaz Bunsen;
- cutii Petri;
- tampoane exsudat;
- densimat/ scala nefelometrică Mc Farland (etalon 0,5 Mc Farland);
- pensa oftalmologică sau repartizor automat de discuri;
- pipete sterile;
- varfuri albastre si galbene pentru pipete automate;
- cristalizor/ recipiente pentru soluţii dezinfectante;
- eprubete sterile de 10/ 10;
- stative eprubete;
- containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

Reactivi

- medii de cultură: plăci cu agar Mueller Hinton sau Hinton sânge turnat în strat uniform de 4 mm grosime (25 ml mediu per placă cu diametrul de 9 mm);
- materiale de control, tulpini de referinţă;
- trusa cu discuri antimicrobiene comercializate de diferite firme (păstrate la 4-8 grade, cu exceptia beta- lactaminelor ce se păstrează la -15 grade);
- ser fiziologic;
- soluţii dezinfectante;
- rigla sau subler
- tulpini de referinţă.

Mediile de cultură sunt preparate în laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind insoţit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerinţele specificate (grosime turnat in placă, ph- ul mediului, sterilitatea, etc). Pentru controlul sterilităţii, o placă din lot este incubată 24 ore la 37º C.

5. Conţinutul procedurii

A. Antibiograma difuzimetrică

Proba este reprezentată de colonii din cultura pură a organismului de testat in creştere activă.

Prin depunerea discurilor cu antibiotice pe suprafaţa unui mediu agarizat preînsămînţat cu bacteria testată, se produce concomitent difuzarea antibioticului şi creşterea bacteriei. După perioada critică de incubaţie se conturează două zone

distincte: una de inhibiţie a creşterii bacteriene, în care antibioticul are concentraţii mai mari decît CMI şi o zonă de creştere bacteriană, unde concentraţia antibioticului este prea mică.

Diametrul zonei de inhibiţie variază invers proporţional cu CMI.

Bacteria testată este clasificată ca sensibilă, intermediară sau rezistentă prin raportarea la tabele interpretative.

5.1. Condiţii prealabile

Mediile de cultură, coloranţii se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri şi recipiente şi apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice.

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticluţe, flacoane) este pregatită pentru utilizare de către asistentul de laborator.

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură şi sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2-3 zile şi se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură şi în cutii cu capac eprubetele, sticluţele şi lamele.

5.2. Elemente de standardizare

Fiecare din componentele utilizate la efectuarea antibiogramei pot influenţa diametrul zonei de inhibiţie şi criteriile de interpretare (e.g. un inocul prea bogat va determina un diametru de inhibiţie mai redus şi invers). Standardizarea trebuie să atenueze diferenţele legate de mediul de cultură, inocul, incubaţie, stabilitatea substanţelor antimicrobiene. Mediul de cultură utilizat pentru efectuarea antibiogramei bacteriilor nepretenţioase nutritiv este geloza Mueller- Hinton şi trebuie să respecte câteva caracteristici:

- ph 7,2-7,4;
- concentraţia gelozei 1,5%-1,7%;
- grosimea stratului de geloză de 4 mm (25 ml mediu pentru o placă de 9 mm)

Conservare: plăcile turnate se pot păstra la frigider în pungi de plastic timp de 7 zile.

Uscare: plăcile scoase din frigider se lasă pe masă timp de o oră şi apoi 10-20 minute la termostat; nu se utilizează plăcile cu lichid de condens pe suprafaţa mediului sau pe capac.

Pentru efectuarea antibiogramei bacteriilor pretenţioase nutritiv se folosesc suplimente nutritive:

- pentru testarea sensibilităţii streptococilor beta-hemolitici, pneumococilor, neisseriilor, mediul MH se suplimentează cu 5% sânge de berbec;
- pentru *Neisseria gonorrhoeae* supliment HYL (sânge lacat + autolizat de levură şi ficat 10%);
- pentru testarea speciilor de *Haemophilus* se adaugă supliment Fields (digestie pepsică de sânge 5%).

Procedura

- Se scot din frigider plăcile cu medii Mueller Hinton/ Hinton sânge şi dipenserele sau ambalajele cu microcomprimate de antibiotice şi se menţin, închise etanş 1-2 ore pentru echilibrare termică.

- Plăcile cu agar MH sau HS se menţin 20-30 minute cu capacul întredeschis în termostat la 37 grade pentru a se usca suprafaţa lor.
- Se pregăteşte inoculul:

Se prelevă ~5 colonii separate dezvoltate pe mediu solid în culturi de 16- 20 ore, se suspendă în ser fiziologic sau bulion şi se ajustează la turbiditatea de 0.5 Mc Farland cu ajutorul densimatului sau prin compararea cu etalonul de sulfat de bariu 0.5 Mc Farland. După pregătirea inoculului, acesta trebuie însămânţat în maxim 15 minute.

În situaţii de urgenţă, poate fi folosit ca inocul, produsul patologic necontaminat (LCR) sau cu contaminare nesemnificativă (probe curate de urină prinsă în zbor din jetul mijlociu) şi se face antibiograma difuzimetrică pe cultura primară. Eşantioanele din hemoculturi sau culturi în bulion ale LCR pot fi folosite pentru prepararea unui inocul.

Însămînţarea plăcilor: se imersează tamponul de vată steril în suspensia etalonată, se scurge excesul de lichid prin rotirea tamponului pe peretele tubului, apoi se descarcă tamponul în striuri paralele pe toată suprafaţa mediului succesiv în trei direcţii prin întoarcerea plăcii cu câte 60 grade, efectuând în final un striu marginal circular.

- Placa însămânţată se lasă 3-5 minute pentru adsorbţia inoculului.
- Se depun discurile cu antibiotice cu ajutorul dispenserului sau cu o pensă, respectînd distanţa de 15 mm de marginea plăcii şi 30 mm între centrele a două discuri vecine. După depunerea discurilor, acestea se presează ferm cu ansa pe suprafaţa mediului.
- Se incubează plăcile 16-18 ore la 37 grade. În termostat nu se incubează mai mult de trei plăci una peste alta.
- Se respectă restricţiile de timp: pentru etalonarea inoculului 15 minute, pentru aplicarea discurilor 5-15 minute şi pentru plasarea plăcilor în termostat 15 minute.
- Atmosfera de incubare este in aerobioză pentru majoritatea microorganismeor, excepţie făcând *Streptococcus pneumoniae, Neisseria spp, Haemophilus* spp, care sunt incubate in atmosfera cu 5-10% CO2.

5.3. Selectarea substantelor antimicrobiene

Substantele antimicrobiene pentru antibiograma sunt livrate sub formă de microcomprimate cu diametrul de 6 mm, având notat simbolul antibioticului. Conservarea lor se face prin menţinerea la adăpost de lumină, căldură şi umiditate (la frigider). Înainte de utilizare se lasă o oră la temperatura camerei pentru echilibrare termică.

Se fac testări cu un număr restrâns de antibiotice selectate pentru grupe largi de microorganisme constituite pe baza particularităţilor de sensibilitate ale unor categorii microscopice (e.g. stafilococi, streptococi, bacili gram negativi) sau a particularităţilor focarului de infecţie (e.g. izolatele urinare).

Pentru grupele de antibiotice cu activitate similară se alege un singur reprezentant (e.g. tetraciclina pentru toate tetraciclinele). Standardul CLSI recomandă seturi de substanţe test pentru testarea sensibilităţii bacteriilor aerobe si facultativ anaerobe, pretenţioase sau nepretenţioase nutritiv.

a. Testarea sensibilităţii stafilococilor

Pentru *Staphylococcus aureus*: penicilina, cefoxitin, eritromicina lângă clindamicină, gentamicina, kanamicina, tobramicina, ciprofloxacina, levofloxacina, cotrimoxazol, rifampicina, cloramfenicol, doxiciclina, tetraciclina, teicoplanina, linezolid, ceftarolin.

Staphylococcus spp coagulazo negativ: oxacilina, cotrimoxazol, gentamicina, ciprofloxacina, gentamicina, eritromicina, clindamicina; pentru cel izolat din UC: oxacilina, ciprofloxacina, gentamicina, cotrimoxazol, nitrofurantoin.

Determinarea tulpinilor de MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilino-rezistent) se face prin utilizarea microcomprimatului de 30 micrograme de Cefoxitin, pe mediu MH adiţionat cu 4% Na Cl şi incubare la 35º C timp de 18-20 ore. A doua zi se citeşte diametrul zonei de inhibiţie: dacă este > 22 mm, tulpina este sensibilă la cefoxitin (oxacilina), iar daca este < 21 mm, tulpina de *S.aureus* testată este rezistentă la cefoxitin (este MRSA).

Determinarea sensibilităţii la Vancomicină se face prin metoda E- test de determinare a CMI.

Testarea sensibilităţii stafilococilor faţă de aminoglicozide este suficientă faţă de kanamicină, tobramicină şi gentamicină. Rezistenţa la kanamicină (fenotip K), la kanamicină şi tobramicină (fenotip KT) sunt predictive pentru rezistenţa la amikacină. Rezistenţa la kanamicină, tobramicină şi gentamicină (fenotip KTG) este predictivă pentru rezistenţa la amikacină şi netilmicină.

Rezistenţa inductibilă MLSB (macrolide, lincosamine, sinergistine B).

Testul difuzimetric recomandat pentru rezistenţa inductibilă MLSB constă în aplicarea pe suprafaţa mediului MH a unui disc de eritromicină în imediata apropiere a unui disc de clindamicină. Aplatizarea zonei de inhibiţie în jurul discului de clindamicină sau lincosamide (aspect de litera „D”) indică un fenotip MLSB inductibil.

Interpretare

Stafilococii sensibili la penicilină şi oxacilină sunt sensibili la toate beta-lactaminele.

Stafilococii sensibili la oxacilină (cefoxitin) şi rezistenţi la penicilina sunt rezistenţi la penicilinele penicilinazo- labile: ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina şi sunt sensibili la celelate beta-lactamine.

Tulpinile de stafilococi rezistente la meticilină, oxacilină sau /şi cefoxitin sunt considerate rezistente la toate beta-lactaminele.

Se comunică în BA şi prezenţa fenotipului MLSB inductibil sub forma “rezistenţă inductibilă la clindamicina”, avertizând astfel clinicianul că utilizarea de clindamicină sau lincosamină nu este recomandată în infecţiile cauzate de aceste tulpini.

b. Testarea sensibilităţii streptococilor

Se efectuează antibiograma difuzimetrică prin prepararea unui inocul cu densitatea 0,5 Mc Farland şi însămânţarea lui pe o placă cu agar MH suplimentat cu 5% sânge de berbec. Microcomprimatele utilizate pentru testarea sensibilităţii streptococilor sunt:

- pentru streptococii beta hemolitici: eritromicina, azitromicina, claritromicina, tetraciclina, levofloxacina, ofloxacina, clindamicina, cloramfenicol (la peniciline şi- au păstrat sensibilitatea şi nu se testează uzual);
- pentru streptococii viridans: cefotaxim, ceftriaxona, eritromicina, azitromicina, claritromicina, tetraciclina, levofloxacina, ofloxacina, cloramfenicol, clindamicina, linezolid; testarea sensibilităţii la penicilină (ampicilină) se face prin determinarea CMI utilizând metoda E- test.

Citirea diametrelor de inhibiţie se efectuează pe suprafaţa mediului.

c. Testarea sensibilităţii pneumococilor

Se procedează ca pentru streptococi, utilizând mediul HS. Pentru testarea sensibilităţii la penicilină se foloseste discul de 1 microgram de oxacilină. Trusa pentru antibiograma pneumococilor conţine discuri de: oxacilină, vancomicină, eritromicină, claritromicină, tetraciclină, levofloxacină, cotrimoxazol, cloramfenicol, rifampicină, clindamicină, linezolid, ceftarolin. Pentru izolatele din lichidul cefalorahidian se utilizează doar: oxacilină, cloramfenicol, rifampicină.

Interpretare: dacă zona de inhibiţie la oxacilină depăşeşte 20 mm, tulpina este sensibilă la penicilină, ampicilină, ampicilină-sulbactam, cefaclor, cefpodoxim, cefuroxim, imipenem, meropenem. Daca diametrul zonei de inhibiţie la oxacilină este mai mic de 20 mm, tulpina de pneumococ poate fi sensibilă, intermediară sau rezistentă la penicilină şi este indicată determinarea CMI pentru a aprecia sensibilitatea la penicilină si cefotaximă (utilizând metoda E-test).

d. Testarea sensibilităţii enterococilor

Antibiograma difuzimetrică pentru enterococi se realizează pe mediul MH, cu incubare 24 ore la 37 grade, utilizând următoarele discuri de antibiotice:

- pentru izolate urinare: penicilină sau ampicilină, nitrofurantoin, ciprofloxacină, gentamicină de 120 micrograme, vancomicină, teicoplanină, linezolid;
- pentru alte izolate: penicilină sau ampicilină, ciprofloxacin, gentamicină de 120 micrograme, eritromicină, doxiciclină, rifampicină, cloramfenicol, vancomicină, teicoplanină, linezolid.

Tratamentul infecţiilor sistemice grave determinate de enterococi (endocardite subacute) se face cu o asociere dintre un agent inhibitor al peretelui bacterian (penicilină, ampicilină sau vancomicină) şi un aminoglicozid. Efectul sinergic nu apare dacă tulpina este rezistentă la penicilină/ ampicilină/ vancomicină sau dacă are rezistenţa inaltă faţă de aminoglicozide.

Testarea nivelului inalt de rezistenţă a enterococilor faţă de aminoglicozide se face utilizând la antibiograma difuzimetrică discuri cu 120 micrograme de gentamicină sau 300 micrograme de streptomicină. După incubarea 24 ore la 35- 37º C, se apreciază diametrul zonei de inhibiţie:

- > 10 mm : sensibilă;
- 7-9 mm: intermediar sensibilă;
- <6 mm: rezistentă.

Interpretare

Tulpinile rezistente la gentamicină sunt rezistente şi la celelalte aminoglicozide, cu excepţia streptomicinei.

Enterococcus faecium e natural rezistent la kanamicină, amikacină, tobramicină, netilmicină.

Tulpinile de enterococ sensibile la penicilină au sensibilitate şi la ampicilină, amoxicilină, ampicilină- sulbactam, amoxicilină- acid clavulanic, piperacilină, piperacilină- tazobactam.

Pentru tulpinile de enterococi sensibile la ampicilină se poate raporta şi sensibilitatea la ampicilină- sulbactam, amoxicilină- acid clavulanic, piperacilină, piperacilină-tazobactam, imipenem.

Microcomprimatele de cefalosporine, clindamicină şi cotrimoxazol pot părea active in vitro faţă de enterococi, dar sunt ineficiente clinic şi nu trebuie raportate ca sensibile.

e. Testarea sensibilităţii meningococilor

Antibiograma difuzimetrică pentru meningococi se efectueaza pe mediul HS, cu incubare 20-24 ore la 37º C, în atmosfera cu bioxid de carbon. Se face testarea cu discuri de cefotaximă, meropenem, cloramfenicol, rifampicină; se pot adăuga microcomprimate de azitromicină, ciprofloxacina, cotrimoxazol, în cazul în care se urmăreşte profilaxia contacţilor din focarul de meningită.

Testarea sensibilităţii meningococilor la penicilină şi cefotaximă se face folosind metoda E- test pentru determinarea CMI. Tulpinile cu CMI < 0,06 micrograme/ ml, sunt sensibile la penicilină, iar cele cu CMI > 0,5 sunt rezistente.

f. Testarea sensibilităţii hemofililor

Antibiograma difuzimetrică pentru hemofili se realizează pe mediul HTM (Haemophilus Test Medium), cu incubare 20-24 ore la 37º C în atmosfera cu CO2. Microcomprimatele utilizate pentru testare sunt:

- pentru izolate din lichidul cefalorahidian: ampicilina, o cefalosporină de generatia a 3-a (ceftriaxonă, cefotaxim sau ceftazidim), cloramfenicol şi meropenem;
- pentru alte izolate: ampicilină, amoxicilină- acid clavulanic, o cefalosporină de generatia a 3-a (ceftriaxonă, cefotaxim sau ceftazidim), meropenem, cloramfenicol, azitromicină, cotrimoxazol, ciprofloxacin, rifampicină, tetraciclină.

Interpretare

Daca tulpina e sensibilă la tetraciclină, atunci are sensibilitate şi la doxiciclină şi minociclină.

Rezistenţa *Haemophilus influenzae* la ampicilină e asociată cu rezistenţa la cloramfenicol, tetraciclina, cotrimoxazol.

g. Testarea sensibilităţii enterobacteriaceelor

Antibiograma difuzimetrică pentru enterobacteriacee se realizeaza pe mediul MH, cu incubare 18-24 ore la 35-37º C. Metoda utilizată ne permite să detectăm şi tulpinile de enterobacteriacee producătoare de beta- lactamaze cu spectru extins (BLSE). BLSE reprezintă beta- lactamaze ce conferă bacteriilor producătoare rezistenţă la peniciline, cefalosporine inclusiv cele de generatia a 4-a, monobactame, dar nu au acţiune asupra carbapenemelor şi cefamicinelor (cefoxitin). Pentru depistarea BLSE utilizăm testul de sinergie între două microcomprimate.

Pe placa cu mediul MH pregătită pentru realizarea antibiogramei (însămânţată cu tulpina de testat), se plasează discul de amoxicilină- acid clavulanic (20/10 micrograme) între un disc cu cefotaxim (30 micrograme) şi unul cu ceftazidim (30 micrograme) sau cefpodoxim (10 micrograme), la o distanţă de 20-30 mm între centre. Dacă tulpina de testat este producătoare de BLSE se observă o deformare a zonelor de inhibiţie a

cefalosporinelor, cu extinderea zonei de inhibiţie către discul de amoxicilină-acid clavulanic, sub forma unui dop de şampanie.

Pentru efectuarea antibiogramei enterobacteriaceelor, folosim în prima etapă discuri de antibiotice uzuale, ce permit şi depistarea BLSE, urmând ca în a doua etapă să testăm tulpina la antibiotice de rezervă (dacă este producătoare de BLSE sau este multirezistentă la antibioticele uzuale). Microcomprimatele utilizate sunt:

- in prima etapă: ampicilină, amoxicilină- acid clavulanic între cefotaxim si ceftazidim sau cefpodoxim, cefoxitin, gentamicină, ciprofloxacin, cotrimoxazol (şi nitrofurantoin pentru izolatele urinare);
- în etapa a 2-a: cefepim, imipenem, ertapenem, meropenem, piperacilină-tazobactam, levofloxacină, tobramicină, amikacină.

Interpretare si raportare

Tulpinile de *Escherichia coli* si *Klebsiella* spp producătoare de BLSE se raportează rezistente la peniciline, cefalosporine şi aztreonam, indiferent de rezultatul antibiogramei.

Pentru izolatele fecale de *Salmonella* şi *Shigella* se raportează numai sensibilitatea la ampicilină, o fluorochinolonă şi la cotrimoxazol, iar pentru izolatele extraintestinale de *Salmonella*, se adaugă sensibilitatea la o cefalosporină de generatia a 3-a şi la cloramfenicol.

h. Testarea sensibilităţii tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiograma difuzimetrică pentru *Pseudomonas aeruginosa* se realizează pe mediul MH, cu incubare 16-18 ore la 35-37º C, utilizând următoarele discuri de antibiotice:

piperacilină, piperacilină- tazobactam, ceftazidim, aztreonam, imipenem, meropenem, colimicină, gentamicină, tobramicină, amikacină, ciprofloxacină.

Tulpinile de *P. aeruginosa* pot dobândi rezistenţa după 3-4 zile de tratament cu un antibiotic, de aceea trebuie retestate din punct de vedere al sensibilităţii la antibiotice.

i. Testarea sensibilităţii tulpinilor de *Acinetobacter* spp

Antibiograma difuzimetrică pentru *Acinetobacter* se realizează pe mediul MH, cu incubare 20-24 ore la 35-37º C, folosind discuri de:

ampicilină-sulbactam, ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem, gentamicină, tobramicină, amikacină, ciprofloxacină, cotrimoxazol, doxiciclină.

5.4. Controlul de calitate

Exactitatea sau acurateţea testului este definită prin concordanţa dintre rezultatul observat (CMI sau diametrul zonei de inhibiţie) şi valoarea adevarată sau acceptată.

Este obligatorie testarea tulpinilor de referinţă, în condiţii identice cu tulpinile de examinat, la fiecare lot nou de microcomprimate şi la fiecare lot nou de mediu achiziţionat sau turnat în laborator.

Tulpini de referinţă utilizate:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

Echipamentele sunt verificate (tehnic şi metrologic) după un program prestabilit.

5.5. Procesarea rezultatelor

Citirea si interpretarea rezultatelor

Se admit pentru citirea antibiogramei numai plăcile cu o cultură corespunzătoare din punct de vedere al purităţii si densităţii.

Se măsoară cu rigla gradată diametrul zonelor de inhibiţie completă, în lumina reflectată, pe spatele plăcii în cazul mediilor transparente sau pe suprafaţa agarului în cazul mediilor cu sânge. La măsurarea zonei de inhibiţie se face abstracţie de hemoliză pe mediile cu sânge, de coloniile fine, periferice, de vălul invaziv format de *Proteus* şi de creşterea pulverulentă în zonele sulfamidei şi trimetoprimului. Coloniile mari din zona de inhibiţie pot fi contaminanţi sau forme rezistente ale bacteriei testate, de aceea trebuie identificate.

În caz de urgenţă, se poate face citirea antibiogramei dupa 5-6 ore de incubare, cu condiţia verificării dupa 16- 18 ore.

Diametrul zonelor de inhibiţie determinat de fiecare antimicrobian testat, se compară cu valorile înscrise în standardul CLSI şi se incadrează în categoria sensibil, intermediar sau rezistent.

Surse de erori

Apar in următoarele situaţii:

- utilizarea unui alt mediu decât MH sau HS pentru efectuarea antibiogramei;
- folosirea de microcomprimate expirate sau degradate;
- însămânţarea unui inocul nestandardizat;
- testarea pe culturi mixte;
- citirea imprecisă a diametrelor zonelor de inhibiţie;
- lipsa controlului de calitate.

Comunicarea rezultatelor

Pentru fiecare tulpină bacteriană testată se comunică rezultatele antibiogramei difuzimetrice, enumerând antibioticele la care tulpina bacteriană este sensibilă, intermediar sensibilă sau rezistentă.

De exemplu, antibiograma unei tulpini de *S. aureus* fenotip MLSB izolată dintr-o hemocultură va fi comunicată în modul următor:

SENSIBIL: ciprofloxacină, levofloxacină, rifampicină, gentamicină, tobramicină, cloramfenicol, teicoplanină, linezolid

INTERMEDIAR: cotrimoxazol

REZISTENT: penicilină, oxacilină, eritromicină, clindamicină (rezistenţă inductibilă), doxiciclină, tetraciclină, kanamicină.

5.6. Activitati finale

Validarea

Validarea tehnică a analizelor este realizată de catre operator.

Validarea bioanalitică a rezultatelor este realizată de catre şeful de laborator.

Raportarea

Comunicarea rezultatelor se face:

-în scris prin buletinul de analiză care este trimis medicului curant ; buletinul de analiză este semnat si parafat de catre responsabilul de analiză şi managerul tehnic.

-în baza de date a laboratorului şi spitalului;

-rezultatele urgenţelor se transmit telefonic medicului curant.

5.B. E-Testul

E- Testul imbina testarea cantitativa cu testarea difuzimetrică.

Se utilizează pentru testare o bandă de 5 mm / 50 mm din plastic inert, pe suprafaţa căreia este fixat un gradient exponenţial de antibiotic, cu 15 diluţii între 0,016 si 256 ml sau 0,002 si 32 mg/L ; pe cealaltă suprafaţă este marcată scala de lectură in µg/ml corespunzatoare CMI.

Se procedează in prima etapă ca la antibiograma difuzimetrică : o placă cu mediu MH/HS este însămânţată cu tulpina de testat, după prepararea unui inocul cu densitatea de 0,5 Mc Farland. Pe suprafaţa plăcii se aplică radiar banda E –test (impregnată cu antibioticul de testat) având scala de lectură in sus. Se incubează 18-24 ore la 35-37º C in atmosfera aerobă sau cu CO2 şi a doua zi se citeste CMI, fiind indicat de intersectia dintre zona eliptică de inhibiţie a culturii şi scala de gradiente a benzii. Valoarea CMI obţinută se compară cu valorile CMI din standardul CLSI, permiţînd încadrarea tulpinii testate ca sensibilă, intermediară sau rezistentă la antibioticul testat.

Utilizăm această metodă pentru :

- testarea sensibilităţii meningococilor şi pneumococilor la penicilină şi cefotaxim,
- determinarea sensibilităţii stafilococului auriu la vancomicină,
- testarea sensibilităţii enterobacteriaceelor la cefotaxim şi combinaţia cefotaxim-clavulanat (pentru depistarea tulpinilor producătoare de BLSE).

6. RESPONSABILITATI

6.1. Managerul tehnic:

Verifică şi aprobă prin semnătură şi parafează buletinul de analiză.

Oferă consultanţă beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită.

Execută analizele pentru care este responsabil şi validează rezultatul acestora prin semnătură şi parafă.

6.2. Responsabilul de analiză

Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize de uz intern. Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deserveşte compartimentul M1, din registrul de lucru , din registrul de comenzi interne şi registrul de comenzi respinse.

Citeşte şi interpretează rezultatele testelor de determinare a sensibilităţii microorganismelor la substanţe antimicrobiene.

Întocmeşte şi tipăreşte buletinul de analiză.

Verifică, semnează şi parafează buletinul de analiză şi îl prezintă managerului tehnic spre aprobare.

6.3. Asistentul de laborator

Preia plăcile cu tulpinile bacteriene izolate pentru realizarea antibiogramei.

Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID- ul probelor în registru de lucru.

Transportă mediile de cultură şi sticlăria pregatită pentru utilizare, în compartimentul de lucru şi pregăteşte mediile de cultură pentru antibiograme.

Efectuează antibiograma difuzimetrică sau E-testul, utilizând microcomprimatele sau benzile cu antibiotice indicate de medic.

Transmite buletinul de analiză registratorului medical.

7. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02
- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 A-F
- Buletinul de analiză FGL-5.8-01

8. ANEXE

Recipientele se umplu cu soluţie doar 80% din capacitate.

Parametrii sterilizarii sunt: temperatura de 121°C, presiunea de 1 atm, timp de 30 min.

Pune apa distilata in cazanul aparatului pana la nivelul gratarului inferior robinetul de drenaj si cel de evacuare fiind corect inchise.

Introdu flacoanele cu mediile de cultura si martorii sterilizarii in cos, lasand spatii libere pentru circulatia nestanjenita a aburului.

Inchide capacul autoclavului etans si se conecteaza la sursa principala de alimentare.

Apasa intrerupatorul principal (se aprinde imediat). Ecranul microprocesorului va afisa ultimul program executat. Se selecteaza programul potrivit (121^0C, 1 atm, 30 minute). Se apasa butonul „START/STOP" pentru a incepe procesul de sterilizare.

Pe ecran apare mesajul "PURGE HEATING" (evacuare a aerului, incalzire). Cand pe ecran apare mesajul "HEATING", temperatura creste treptat de la 20 la 121^0C.

Cand temperatura a ajuns la 121^0C, timp de 30 min. pe ecran apare mesajul STERILIZING, ceea ce reprezinta efectuarea sterilizarii la parametrii indicati.

La terminarea procesului de sterilizare pe ecran apare mesajul END OF PROCESS, insotit de un semnal sonor. Se apasa tasta STOP .

Se deschide robinetul de evacuare a aburilor si se asteapta pana cand acul manometrului revine la 0.

Se deschide capacul autoclavului si se scot materialele supuse sterilizarii si martorii eficientei sterilizării.

Racordati etuva la reteaua electrica.

Apasati intrerupatorul general; se va aprinde.

Plasati in etuva materialele de sterilizat ambalate, lasand spatii intre ele. Incepeti cu prima tava, **niciodata** direct pe fundul raftului inferior al etuvei.

Plasati martorii sterilizarii.

Mutati butonul termostatului de siguranta la capatul gradatiei sau minim 35°C peste temperatura de regim.

Cand temperatura este stabilizata la temperatura fixata, rotiti usor butonul termostatului de siguranta in sens opus acelor de ceasornic, pana cand se aprinde indicatorul cu lumina rosie.

Rotiti usor butonul butonul in sensul acelor de ceasornic si tineti apasat butonul de resetare pana cand indicatorul cu lumina rosie se stinge. Indicatorul luminos trebuie sa fie stins.

Dupa atingerea parametrilor de sterilizare (180°C, 60 minute), intrerupeti alimentarea.

Scoateti materialele din etuva numai dupa ce se racesc.

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase”Sf.Parascheva„ Iaşi **Laboratorul de analize medicale**	**INSTRUCTIUNE DE LUCRU** **COD: IL-M1-03** **MOD DE LUCRU** **HOTA CU FLUX LAMINAR VERTICAL**	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 1 din 1

Se stabilesc etapele de lucru si se strang materialele necesare in apropierea dispozitivului.

Se porneste ventilatorul si se ajusteaza viteza de lucru.

Se dezinfecteaza spatiul de lucru si ustensilele ce vor fi introduse in incinta.

Se aseaza materialele in incinta astfel incat sa nu impiedice fluxul de aer. Se lasa o distanta de 10-15 cm fata de margini.

Se lasa aparatul sa functioneze 10-20 minute inainte de inceperea lucrului.

Dupa folosire se dezinfecteaza suprafata de lucru.

Se regleaza viteza ventilatorului la minim si se mentine ventilatorul in functiune pana la sfarsitul zilei de lucru.

Circulatia persoanelor prin incapere se va reduce la minim.

Intretinere:

Filtrul primar se spala (apa calda, detergent) dupa aproximativ 160 ore de functionare sau de 1-2 ori pe luna. Se inlocuieste dupa 5-7 spalari.

Extrage filtrul din aparat prin ridicarea gratarului aflat pe panoul frontal.

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase”Sf.Parascheva„ Iaşi Laboratorul de analize medicale	INSTRUCTIUNE DE LUCRU **MOD DE LUCRU** **pH-metru** **COD: IL-M1-04**	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 1 din 1

Apasati scurt orice tasta pentru a porni aparatul. Daca nu este conectat nici un electrod, apare mesaj de eroare.

Imerseaza electrodul aproximativ 2 mm in solutia de masurat.

Cat timp citirea nu s-a stabilizat, valoarea masurata clipeste.

Poti schimba masurarea intre pH si mV.

Asteapta stabilizarea citirii. O valoare stabila afost atinsa cand valoarea citita nu mai clipeste.

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA OPERATIONALA

SISTEMUL INFORMATIC

Cod: POL - 03

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager General
Prof. Dr. Carmen Dorobăţ

VERIFICAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

Elaborat:
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborila

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		Lorena Zaborila					
Manager General	1.		Prof.Dr. Carmen Dorobăţ					
Manager Tehnic	2		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Microbiologie I	3.		Conf. Dr. Olivia Dorneanu					
Sef compartiment Microbiologie II	4.		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Imunologie	5.		Dr. Cristina Petrovici					
Sef compartiment Hematologie	6		Dr. Denisa Covaciuc					
Sef compartiment Biochimie	7		Chim prin. Valentina Holban					
Sef compartiment HIV-SIDA (biologie moleculara)			Dr. Aida Badescu					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1. SCOP 5
2. DOMENIUL DE APLICARE 5
3. DOCUMENTE DE REFERINTA 5
4. DEFINITII SI ABREVIERI 5
5. DESCRIEREA ACTIVITATII 5
5.1. MEDIUL DE LUCRU 5
6. RESPONSABILITĂŢI 9
7. INREGISTRARI 9

1. SCOP

Aceasta procedura are ca scop prezentarea politicii şi a modului de acţíune în vederea protejării pacienţilor de daunele pricinuite de pierderea sau modificarea datelor păstrate pe suport informatic.

Aceasta procedura are ca scop:

- stabilirea de reguli de utilizare a informatiilor in format electronic , la nivelul laboratorului de analize medicale astfel incat aceste informatii sa fie protejate si sa fie pastrata confidentialitatea lor.
- gestionarea activitatilor medicale din laborator si integrarea aparatelor medicale de analiza

2. DOMENIUL DE APLICARE

Prezenta procedura se aplica de catre personalul Laboratorului de analize medicale al **Spitalul Clinic de Boli Infecţioase" Sf.Parascheva„ Iaşi,** care utilizează sistemul informatic al laboratorului.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

3.1. **MANUALUL CALITATII**, Cod: MCL-01.

3.2. SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;

3.3. SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.

3.4 SR ISO 15190:2005 – Laboratoare medicale. Cerinte pentru securitate.

4. DEFINITII SI ABREVIERI

4.1. Definitii - Nu este cazul

4.2. Abrevieri - Nu este cazul.

5. DESCRIEREA ACTIVITATII

5.1. Mediul de lucru

Echipamentele informatice din cadrul laboratorului sunt întreţinute conform specificaţiilor producătorului, iar locul în care se află asigură condiţii de mediu corespunzătoare. Componentele calculatoarelor sunt uşor accesibile echipamentelor de intervenţie în caz de incendiu.

Calculatoarele şi echipamentele din laborator sunt prevăzute cu o sursă de energie neîntreruptibilă (UPS).
Echipamentul informatic este protejat împotriva accesului neautorizat prin reglementarea accesului în laborator şi parolarea fişierelor.

5.2. Securitatea sistemului

Informaţiile din Trimiterea de analize de la medical solicitant şi din Formularul de cerere sunt introduce în baza de date a laboratorului de către asistenţii care răspund de acest lucru prin Fişa postului. Accesul la aceste informaţii este parolat şi permis doar asistenţilor respectivi şi Şefului de laborator.

Fiecare responsabil de analiză care lucrează cu analizoarele automate conectate la calculatorul central accesează programul de calibrare şi de lucru propriu-zis prin folosirea unei parole proprii fiecărei personae. După efectuarea analizei, datele din programul analizorului nu pot fi accesate decât prin introducerea parolei de către responsabilul de analiză respectiv. Datele transferate de la analizor în calculator nu pot fi modificate.
Rezultatele analizelor netransmise în calculator sunt introduse manual de către responsabilii de analiză, accesul fiind de asemenea parolat. După introducerea datelor, responsabilii de analiză verifică corectitudinea rezultatelor introduse. În cazul unor greşeli de tipărire, documentul va fi salvat sub un alt nume şi numai după aceea vor putea fi introduse corecţiile.

Salvarea datelor se realizează lunar pe server de catre firma care gestioneaza sistemul informatic.

5.3. Date şi rapoarte

5.3.1 Mod de documentare
Aplicatia software este documentata prin manuale de utilizare ale echipamentelor de hematologie si biochimie

5.3.2 Protectia, integritatea si confidentialitatea datelor
Integritatea datelor este asigurata de serverul de baze de date, care realizeaza si un back-up zilnic, al intregii baze de date – pentru analizorul de biochimie.

5.3.3 Mod de intrare date
a. Datele se introduc astfel: biletele de trimitere contin datele pacientilor si investigatiile care se introduc in calculator de la tastatura
b. Pentru analizoarele de biochimie , coagulare,hematologie se tiparesc liste de lucru

5.3.4 Mod colectare date
Colectarea datelor urmareste urmatoarele etape:
- Introducerea datelor de identificare unice ale pacientului – numar de ordine
- Introducerea analizelor pe cerere
- Emiterea listelor de lucru, in format electronic
- Obtinerea rezultatelor de la analizoare- tiparirea

5.3.5 Validare soft

Datele de intrare si rezultatele sunt validate de seful de laborator, iar rapoartele au fost verificate in ceea ce priveste componenta si exactitatea lor. Odata validate, datele de pe o cerere nu mai pot fi modificate.

5.3.6 Transmisie, procesare, stocare si salvare date

- Datele sint stocate pe un server dedicat de baze de date
- Rezultatele colectate de la aparate sunt preluate de un server special pentru aceasta operatie
- Datele se stocheaza pe hard-diskuri cuprinse in serverul de baze de date

5.3.7 Mentenanta calculatoarelor

Mentenanta calculatoarelor se face de catre personal desemnat in baza unui contract de service, in momentul cind se face upgrade de pachet software sau la cerere, in momentul aparitiei unei defectiuni

5.3.8 Acces la informatii

Sistemul permite accesul la informatii tuturor persoanelor din laborator, care prin fisa postului, au fost desemnati sa utilizeze softul. Accesul la informatiile stocate se face prin intermediul programului informatic pe baza unui cont si a unei parole unice pentru fiecare persoana din laborator.

5.3.9 Trasabilitatea informatiilor

Sistemul ofera posibilitatea urmaririi in mod automat a informatiilor, de la punctul de intrare in sistem (introducerea pacientului si a serviciilor) si pina la destinatia finala (tiparirea rezultatelor). Se poate monitoriza orice etapa de procesare cu utilizatorul care a intervenit in proces.

Spre exemplu, se poate determina momentul la care au fost modificate datele pacientului sau rezultatele analizelor, precum si utilizatorul sau statia de la care a efectuat aceasta operatiune.

5.3.10 Etape operationale

- Produsele biologice recoltate in laborator sunt identificate prin crearea unei cereri, identificate unic printr-un numar de cerere, asociat pacientului.
- Se bifeaza analizele solicitate
- Dupa efectuarea analizelor, exista doua modalitati de colectare a datelor: analizoarele de hematologie, biochimie transmit automat rezultatele, in functie de ID, catre serverul central, iar pentru celelalte analize, rezultatele se introduc manual de catre persoana responsabila.
- Se tiparesc buletinele de analiza, sunt verificate si parafate de seful de laborator

Săptămânal, Şeful de laborator compară prin sondaj rezultatele originale de pe print-ul analizoarelor cu datele transmise în calculator, pentru a se asigura de integritatea transferului de date şi detectarea erorilor în transmiterea, păstrarea sau procesarea datelor.

În cazuri excepţionale în care laboratorul acceptă pentru analiză probe necorespunzătoare (lipemice, hemolizate) care ar putea compromite acurateţea rezultatelor, în Buletinul de analiză se menţionează acest aspect.

Printr-un cod de acces special, conform programului, Şeful de laborator poate verifica în orice moment persoanele care au introdus date sau care au efectuat modificări ale acestora.

Informaţiile arhivate, prin caracteristicile programului, sunt uşor şi simplu de gasit, în limitele de timp corespunzatoare cerintelor de îngrijire a pacienţilor.
Calculatorul poate reproduce în orice moment rezultatele analizelor arhivate, inclusiv

Buletinele de analiză, intervalul biologic de referinţă indicat iniţial pentru o analiză, comentarii interpretative ataşate rezultatelor, incertitudinea de măsurare, date referitoare la validarea metodelor, etc. La aceste informaţii are acces numai Şeful de laborator. Accesul altor personae se realizează numai cu acceptul scris al Şefului de laborator

Suporturile pentru stocarea datelor, CD –uri sunt etichetate, menţionându-se pe etichetă tipul datelor şi perioada la care se referă. Aceste suporturi sunt păstrate într-un dupal încuiat, în responsabilitatea Şefului de laborator.
Programul este prevăzut cu un sistem de recuperare a datelor, pentru a se preveni pierderea datelor pacientilor în cazul defecţiunilor de hardware sau software.
Computerul server care monitorizează activitatea hardware si software este testat periodic pentru a se asigura funcţionarea corespunzătoare.
Activităţile de întreţinere preventivă pentru toate componentele hardware se programează şi înregistrează conform PGL – 5.3 "Echipament de laborator".
Personalul autorizat verifică sistemul după fiecare back-up sau fiecare restaurare a fisierelor de date, pentru a se asigura ca nu au aparut modificari nedorite.
Erorile detectate pe parcursul operatiei de back-up sunt înregistrate în Fişa de neconformitati, actiuni corective/preventive cod : FGL – 4.9 – 01, acţionţându-se ulterior conform PGL – 4.9, PGL – 4.10 şi PGL – 4.11.

În cazul în care se realizează modificări ale hardware-ului sau software-ului, sistemul nu este utilizat până când respectivele modificări nu sunt verificate, validate si complet documentate de către personalul atestat, care răspunde de program, pentru a se putea atesta ca aceste modificari sunt acceptable si adecvate.

Şeful de laborator răspunde de furnizarea corecta a rezultatelor analizelor către medicul solicitant. În acest scop, verifică şi aprobă schimbarile din sistemul informatic care ar putea afecta corectitudinea datelor referitoare la pacient..

Laboratorul raportează orice disfuncţionalitate a echipamentului informatic Responsabillui de sistem sau furnizorului programului.

Toate întreruperile neprogramate ale computerelor sau oricare alte probleme identificate, precum şi defecţiunile, acţiunile întreprinse, reparaţiile, verificările la repornirea tuturor elementelor sistemului pentru a se asigura integritatea datelor si

funcţionarea adecvata a sistemului sunt înregistrate în - Fisa de evidenţă a echipamentului cod : FGL – 5.3 – 03.

În cazul unei defecţiuni a sistemului informatic se iau măsuri pentru ca rezultatele pacienţilor să fie raportate într-o manieră promptă şi corectă.

6. RESPONSABILITĂŢI

6.1. Managerul General

- asigură resursele pentru funcţionarea adecvată a sistemului informatic ;

6.2. Şeful de laborator

- verifică integritatea transferului de date şi detectarea erorilor în transmiterea, păstrarea sau procesarea datelor;
- verifică şi aprobă schimbarile din sistemul informatic care ar putea afecta îngrijirea pacientului.
- răspunde de furnizarea corecta a rezultatelor analizelor către medicul solicitant
- răspunde de păstrarea în siguranţă a suporturilor pentru stocarea datelor

6.3. Responsabilul de sistem

- răspunde de realizarea întreţinerii preventive, a reparaţiilor, verificărilor la repornirea tuturor elementelor sistemului pentru a se asigura integritatea datelor si funcţionarea adecvata a sistemului ;
- verifică funcţionarea corectă a programului în momentul instalării şi după verificări ;
- instruieşte personalul laboratorului răspunzător de utilizarea sistemului informatic ;

7. INREGISTRARI

- Fişa echipamentului cod : FGL – 5.3 - 03;
- Plan de întreţinere preventivă, cod : FGL – 5.3 – 05;
- Fişa de neconformităţi, acţiuni corective/preventive cod : FGL – 4.9 - 01

8. Anexe – nu sunt

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA OPERATIONALA

ETICA ÎN LABORATORUL DE ANALIZE MEDICALE

Cod: POL - 04

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager General
Prof. Dr. Carmen Dorobăţ

VERIFICAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

Elaborat:
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborila

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		Dr. Diana Matei					
Manager General	1.		Prof.Dr. Carmen Dorobăţ					
Manager Tehnic	2		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment HIV-SIDA (biologie moleculara)	3.		Dr. Aida BADESCU					
Sef compartiment Microbiologie I	4.		Conf. Dr. Olivia Dorneanu					
Sef compartiment Imunologie	5.		Dr. Cristina Petrovici					
Sef compartiment Hematologie	6		Dr. Denisa Covaciuc					
Sef compartiment Biochimie	7		Chim prin. Valentina Holban					
RENAR	8		Ing. Cristian Nichita					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1. SCOPUL 5
2. DOMENIUL DE APLICARE 5
3. DOCUMENTE DE REFERINTA 5
4. DEFINITII SI ABREVIERI 5
5. DESCRIEREA ACTIVITATII 5
6. RESPONSABILITATI 6
7. INREGISTRARI 7
8. ANEXE- NU SUNT 7

1. SCOPUL

Prezenta procedura prezinta acţinule întreprinse în cadrul laboratorlui, în vederea respectării codului de etică profesională, pentru asigurarea bunăstării pacientului şi păstrarii confidenţialităţii informaţiilor.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Prezenta procedura se aplica de catre intreg personalulul laboratorului de analize medicale al Spitalul Municipal - Lupeni.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

3.1. **MANUALUL CALITATII** , Cod: MCL -01

3.2. SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;

3.3. SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.

3.4. SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.

4. DEFINITII SI ABREVIERI

4.1. Definitii – nu sunt

4.2.Abrevieri- nu sunt

5. DESCRIEREA ACTIVITATII

5.1. EFECTUAREA ANALIZELOR

Personalul laboratorului tratează toţi pacienţii în mod egal, fără discriminări, probele fiind identificate printr-un cod atribuit la înscrierea pacientului în baza de date.
Informaţiile referitoare la pacient sunt numai cele necesare interpretării rezultatelor şi nu includ detalii personale.

Toate procedurile efectuate asupra unui pacient se realizează numai cu consimţământul acestuia. Pentru majoritatea procedurilor de rutină ale laboratorului, se presupune acordul pacientului numai prin prezenta lui benevolă în laborator însoţit de Trimiterea de analize medicale sau cu Formularul de cerere. În cazuri speciale sau în cazul solicitărilor verbale de analize din partea pacientului, se completează Formularul de consimţământ, cod: FGL-5.4-01- 01 . Înainte de supunerea la procedura uzuala de recoltare, de exemplu puncţia venoasă, pacientul este informat de către asistenta care recoltează, cu privire la procedura ce va avea

loc. Pacientului i se prezintă, de asemenea şi faptul că sistemul folosit pentru recoltare este de unică utilizare.

În anumite cazuri (analize serologice) laboratorul ia măsuri ca rezultatele cu implicaţii grave să fie transmise medicului solicitant sau să nu fie transmise direct pacientului decât în urma unei consilieri adecvate din partea Şefului de laborator sau a unei persoane desemnată de acesta.

Evitarea conflictelor de interese se realizează prin faptul că laboratorul este subordonat direct Managerului al **Spitalul Clinic de Boli Infecţioase" Sf.Parascheva„ Iaşi**, iar probele sunt codificate.

Probele recoltate de la pacient nu sunt utilizate pentru efectuarea altor analize decât cele solicitate. Repetarea analizelor în cazul apariţiei unei neconformităţi se realizează numai în urma deciziei scrise a Şefului de laborator. În cazul în care medicul solicită efectuarea unor analize suplimentare, aceasta se realizează numai în scris, prin completarea unei Trimiteri de analize medicale sau a unui Formular de cerere de analize medicale.

Laboratorul se asigură că rezultatele analizelor sunt interpretate corect printr-o permanentă legătură cu medicii solicitanţi, prin transmiterea Manualului de recoltare unde sunt prevăzute detaliile tehnice referitoare la metodele utilizate de laborator, la performanţele acestora, la echipamentele folosite, la intervalele biologice de referinţă. Orice feed – back de la beneficiari este înregistrat şi rezolvat cu promptitudine, conform PGL - 4.8 – « Rezolvarea reclamaţiilor ».

5.2.Asigurarea Confidenţialităţii

Fiecare salariat este obligat să respecte secretul profesional, conform reglementărilor PGL -5.1. « Personal ».

Accesul în laborator este reglementat prin procedura « Condiţii de mediu şi de lucru », cod : PGL- 5.2. şi prin reguli afişate pe uşa de intrare a laboratorului.

La compartimentul Recoltare există condiţii corespunzătoare asigurării confidenţialităţii, în camera respectivă nemaiavând loc şi alte activităţi, iar accesul este permis unei singure persoane.

Toate înregistrările referitoare la pacient sunt păstrate în condiţii care asigură protecţia împotriva piederii, accesului neautorizat, falsificării sau utilizării greşite, în dulapuri încuiate aflate în laborator sau în camera special amenajată pentru arhivă. Păstrarea acestor înregistrări se realizează pentru o perioadă de timp reglementată prin procedura "Înregistrări tehnice şi de calitate", cod:PGL- 4.13. Accesul persoanelor din afara laboratorului la aceste înregistrări se realizează numai cu acceptul scris al Şefului de laborator.

Eliberarea rezultatelor se realizează numai către persoanele menţionate în contract, cu solicitarea datelor de identificare a acestora.

Rezultatele analizelor de laborator sunt confidenţiale, cu exceptia cazului în care exista autorizare pentru divulgarea lor. Rezultatele sunt raportate în mod normal pacientului, medicului solicitant si pot fi raportate si altor parti, cu acordul pacientului sau conform cerintelor legale.

Raportarea telefonică a rezultatelor se realizează numai prin înregistrarea acestei acţiuni în Registrul pentru înregistrarea transmiterii telefonice a rezultatelor, în cazul unor motive bine întemeiate şi solicitând date de identificare a persoanei care recepţionează rezultatele.

6. RESPONSABILITATI

6.1. Şeful de Laborator

- Instruieşte personalul laboratorului cu privire la păstrarea confidenţialităţii ;
- Verifică implementarea prezentei proceduri ;

6.2. Responsabilii de Analiza si Asistentii de Laborator

- îşi însuşesc şi respectă prezenta procedură ;

7. INREGISTRARI

- Registrul pentru înregistrarea transmiterii telefonice a rezultatelor,
- Declaraţia de confidenţialitate, cod: FGL – 5.1- 02;
- Procese verbale de instruire ale personalulu cu privire la asigurarea confidenţialităţii;

8. ANEXE - Nu sunt

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA OPERATIONALA

EFECTUAREA CONTROLULUI INTERN DE CALITATE IN MICROBIOLOGIE

COD: POL – 06

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborila

Elaborat:
Sef laborator

Dr. Rodica Fântânaru

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Microbiologie I	2.		Conf. Dr. Olivia Dorneanu					
Sef compartiment Microbiologie II	3		Dr. Rodica Fântânaru					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1.SCOP 5

2. DOMENIUL DE APLICARE 5

3. DOCUMENTE DE REFERINTA 5

4. DEFINITII SI ABREVIERI 5

4.1. DEFINIŢII 5
4.2. ABREVIERI 5

5. DESCRIEREA ACTIVITATII 6

6. RESPONSABILITATI 6

7. INREGISTRARI 9

1. SCOP

Această procedură se aplică pentru realizarea controlui intern in cazul analizelor de microbiologie.

2.DOMENIU DE APLICARE

CIC se utilizează pentru :
a.Testarea calităţilor nutritive şi a propietăţilor selectiv-diferentiale ale mediilor de cultură.
b.Testarea testului de sensibilitate a bacteriilor la antibiotice.
c.Verificarea testelor de identificare a bacteriilor inclusiv identificarea antigenică.

3. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ ŞI CONEXE

3.1 Documente de referinţă

- **SR EN ISO 15189: 2007** – Laboratoare medicale. Cerinţe Particulare pentru Calitate si Competenţă
- **SR ISO / TR 22869:2005** – Laboratoare medicale - Ghid pentru Implementarea in Laboratoare a ISO 15189: 2003
- Tratat de microbiologie clinica D. Buiuc – Ed. Medicala – Bucuresti – 2009
- NCCLS , varianta in vigoare

3.2 Documente conexe

Instrucţiuni de lucru Hota cu flux laminar.
Instrucţiuni de lucru Termostat.
Instrucţiuni de lucru Densimat.
Proceduri operaţionale Pregătirea mediilor de cultură .

4. ABREVIERI ŞI DEFINIŢII

Inocul - Suspensia unor colonii bacteriene intr-un bulion nutritiv.
Microcomprimat - Rondea de hartie impreganata cu anumita cantitate de antibiotic.
Unitati Mc Farland - Unitate de masura a densitatii inoculului.
Mediul Mueller Hinton - Mediu de cultura recomandat pentru testarea bacteriilor aerobe care asigura condiţii nutritive reproductibile pentru cresterea optimă a microbilor fără să interfereze cu activitatea antimicrobiană a substanţelor testate.
- este mediul pe care sunt determinate standardele interpretative ale NCCLS

Mediul Drigalski - Mediu selectiv diferential pentru enterobacterii;permite diferenţierea bacililor gram negatvi lactozo pozitivi de cei lactozo negativi si inhibă creşterea bacteriilor gram pozitive.
CIC - Control intern de calitate
CMI - Concentraţie minimă inhibitorie
ESBL - Beta lactamaze cu spectru extins

ATCC - American Type Culture Colection
NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards
Tulpini de referinţă -Tulpini de colecţie furnizate de ATCC in vederea obţinerii unor culturi de referinţă
Culturi de referinţă - O cultură obţinută prin pregătirea microorganismului dintr-un tip de cultura de colecţie.
Cultură de stoc - Este obţinută prin pregătirea microorganismului printr-o derivare dintr-o cultură de referinţă.
Cultruri de lucru - Este obţinută prin derivarea dintr-o cultură de stoc de referinţă.
Subculturi - Reprezintă transferul pe un mediu proaspăt a microorganismelor a căror creştere pe medii a fost stabilită. Creşterea ulterioară pe mediul proaspăt constituie o subcultură sau un pasaj.

5. REACTIVI SI SUBSTANŢE

Mediul Drigalski - turnat in placi Petri
Plăci cu agar sange de berbec 5%
Eprubete cu coloană de agar.
Mediul Mueller Hinton turnat in strat uniform de 4 mm grosime (25ml/placa de 90mm)
Microcomprimate (diametrul standard de 6,35mm) cu antibiotic
Tulpini de referintă:
- E. Coli ATCC – 25922
- S. Aureus ATCC – 25923
- Pseudomonas aeruginosa ATCC-27853
- Streptococcus Pyogenes ATCC -19615
- Bulion nutritiv steril

6.ECHIPAMENTE SI RESURSE

Sistem de determinare a densităţii inoculului DENSIMAT
Hota cu flux laminar
Termostat
Bec Bunsen
Placi Petri de 90 mm sau de120mm, cu fundul plat, transparent
Anse
Lupa
Dispenser
Eprubete mari
Ecuvioane sterile
Rigla

7. MODUL DE LUCRU

7.1 Condiţii de mediu

Tulpinile de referinţă se pastrează in ambalajul original , conform indicaţiilor producătorului, la 2-8 grd C , până la data expirării inscrisă pe ambalaj,sub cheie.

După reconstituire ,cultura primară se păstrează intre 2-8 grade C timp de 7 zile,placa este etichetată cu denumirea "Cultura primară" și se notează data.Se tine seama de următoarele considerații:

-creșterea bacteriana din „cultura primară" TREBUIE subcultivată cel puțin o dată inainte de utilizare

-după efectuarea subculturii , cultura primară trebuie inlăturată in ziua a 8-a.

-orice subcultură din „creșterea primară" trebuie înlăturată si NU trebuie continuată in ziua următoare.

Subculturile efectuate din cultura primară se conservă in coloană de agar nutritiv.Acestea se păstrează la 2-8 grd C timp de 6-12 luni.Eprubetele continand agarul nutritiv cu subculturi se codifică si se păstrează sub cheie.

Conservarea in coloana de agar nutritiv este indicată pentru Enterobacteriaceae și pentru alte bacterii nepretențioase .

7.2 Definitie

1. CIC reprezintă totalitatea procedurilor efectuate pentru evaluarea continuă a activităţii şi se realizează cu ajutorul unui program de controale periodice care demonstrează că variabilitatea este sub control .Monitorizarea exactităţii si preciziei testelor de sensibilitate se realizează utilizand tulpini de referinţă.

Controlul sistematic al fiecărui factor individual de eroare nu este posibil.Standardele uzuale controlează prin tulpini de referinţă, la fiecare testare , incadrarea punctului final al citirii in limitele acceptate ale erorii.

2. Orice program de control a calității mediilor de cultură trebuie să verifice sterilitatea, calitătile nutritive si după caz , selective și diferențiale.

7.3 Proba:

Pot fi utilizate pentru testări următoarele tipuri de culturi:

-creșterea bacteriană din „cultura primară"

-creșterea bacteriană din subculturi;subculturile se obțin conform specificaților tehnice ale producărorului.

-culturi efectuate din tulpinile conservate in agar nutritiv care se cultiva pe mediu agar corespunzător neselectiv.Se procedează in felul următor:

- eprubeta respectivă se scoate din frigider, se aduce la temperatura camerei, se adaugă aproximativ 2 ml de bulion nutritiv și apoi se termostatează la 37 grade C 1-2 ore. Din această cultură se face o însămantare pe mediul corespunzător tulpinii prelucrate.
- placa insămațată se termostatează la 37grade C , 16-18 ore.
- din cultura de a doua zi se fac testările dorite.

8.CONTROL INTERN

8.1 Controlul intern al antibiogramei difuzimetrice

In paralel cu tulpina testată,se testează , in aceleași condiții,și tulpina de referință adecvată. Se citesc diametrele zonelor de inhibiție ale tulpinilor de referință și se compară cu valorile standard.

Se urmăresc posibilele neconcordanțe apărute , cauzele și remediile .

Neconcordanțe sesizabile prin controlul de calitate al testelor de sensibilitate la antibiotice: cauze și remedii.

Neconcordanța	Cauze posibile	Remedii
Diametrul zonelor de inhibiție prea mic; CMI prea mare (falsă rezistență)	Alterarea antibioticului Inocul prea dens Strat de agar prea gros Citire incorectă a rezultatelor Modificarea tulpinii de referință	Verifică discurile/soluția stoc/pulberea etalon cu un nou lot Verifică și etalonează corect inoculul dacă se impune Verifică grosimea mediului din placă Reia citirea cu mai mulți observatori Repică din conversul inițial al tulpinii de referință și compară
Diametrul zonelor de inhibiție prea mare; CMI prea mică (falsă sensibilitate)	Antibiotic supradozat Inocul prea sărac Strat de agar prea subțire Depășirea intervalului prevăzut pentru etalonarea inoculului, însamînțare, depunerea discurilor și introducerea plăcilor în incubator Intîrzierea momentului critic al culturii: Incubare în teancuri mai mari de trei plăci Incubare la temperatură inferioară celei prescrise Modificarea tulpinii de referință	Verifică discurile/soluția stoc/pulberea etalon cu un nou lot Verifică și etalonează corect inoculul dacă se impune Verifică grosimea mediului din placă Verifică protocoulul de lucru; corectează Verifică și corectează Verifică termostatul Repică din conversul inițial al tulpinii de referință și compară
Rezultatele testării pseudomonadelor față de aminoglicozide în afara limitelor acceptate pentru martor	Concentrația de Ca^{2+} și Mg^{2+} incorectă	Suplimentează bulionul Mueller – Hinton cu Ca^{2+} și Mg^{2+}: verifică noile loturi de agar (vezi textul)
Neconcordanța	Cauze posibile	Remedii
Rezultatele testării pseudomonadelor față de carbenicilină în afara lmimitelor acceptate pentru martor	Mutații ale tulpinii de referință	Repică din conversul inițial al tulpinii de referință și compară

Sensibilitate prea mare față de tetraciclină și rezistență prea mare față de aminoglicozide și macrolide	Mediul de cultură prea acid	Verifică și corectează pH-ul mediului
Rezistență prea mare la tetraciclină și sensibilitate prea mare la aminoglicozide și macrolide	Mediul de cultură prea alcalin	Verifică și corectează pH-ul mediului
Fața de trimetoprim: diametrul zonei de inhibiție prea mic sau CMI prea mare; rezultate dificil de citit	Mediul de cultră cu exces de timidină	Testează mediul cu Enterococcus faecalis ATCC 29212 sau 33186
Colonii în zona de inhibiție	Variante rezistente ale tulpinii testate sau Testare unei culturi mixte	Replică coloniile rezistente pentru identificare și retestare

8.2 Controlul de calitate al mediilor de cultură:calităţile nutritive şi selective.

Cand se aplică:
-la inceputul unui nou lot de mediu de cultură.
-de cate ori mediile respective nu dau rezultatele de cultivare aşteptate sau apar modificări culturale ale microorganismelor cultivate.

Se utilizează tulpinile de referinţă indicate in certificatele de calitate ale mediilor:
- pentru mediul DRIGAKSKI:
  - E. Coli ATCC 25922:creşte bine,lactozo +
  - S. Aureus ATCC 25923:inhibiţie
- pentru mediul C.L.E.D.:
  - E.Coli ATCC 25922: creşte bine,lactozo +
  - S. Aureus ATCC 25923: creşte bine,lactozo +
  - Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853: creşte bine,lactozo-
- pentru mediul HEKTOEN:
  - E. Coli ATCC 25922:inhibiţie parţială,colonii mici
  - S. Aureus ATCC 25923:nu creşte
  -Salmonella Enteritidis ATCC 13076:colonii albastre –verzui cu centru negru
- pentru Geloză Columbia cu sange de berbec5%:
  -Streptococcus Pyogenes ATCC 19615:creşte bine in 24 de ore,reacţie hemolitică caracteristică
  - E.Coli ATCC 25922: creşte bine, reacţie hemolitică caracteristică
  - S. Aureus ATCC 25923: creşte bine, reacţie hemolitică caracteristică.

In cazul in care rezultatele nu sunt cele aşteptate se pot căuta cauzele de eroare.
Se poate alcătui un **buget de incertitudine**:
-apa de calitate şi in volum necorespunzător pentru reconstituirea mediului.

-cantărirea.Sunt necesare balanţe calibrate in mod corespunzător pentru cantărirea materialeleor deshidratate.Erorile de cantărire pot modifica semnificativ compoziţia produsului final.

-pH necorespunzător. Se verifică pH-ul fiecărui lot de mediu.PH-ul creşte odată cu scăderea temperaturii, de aceea pH-ul mediilor lichide se determină la temperatura camerei iar pentru mediile agarizate care pot fi testate numai la 50 de grade ,trebuie acceptate limite de toleranţă.

-condiţionarea:mediile trebuie distribuite cu grijă şi în condiţii aseptice în plăci şi în tuburi;cantitatea necorespunzătoare poate face mediul impropriu utilizării.Astfel per placă Petri cu diametrul de 90 mm pentru uzul general sunt necesari 15-18 ml mediu .

-sterilizarea corectă.Dacă sterilizarea se produce la o temperatură prea mare sau prea mult timp unii constituenţi pot fi degradaţi.

-sticlăria poate inhiba dezvoltarea unor bacterii sensibile prin reziduri de la utilizări anterioare.

9. RESPONSABILITĂŢI

9.1 Seful de laborator

- Stabileşte oportunitatea efectuării CIC.
- Prelucrează tulpinile .
- Face citirile şi interpretările.
- Face inregistrările in caietul de control inern.
- Verifică corectitudinea execuţiei.

9.2 Asistentul de laborator

- Face pregatirile preliminare:pregăteste sticlăria, face sterilizările etc.
- Prepară mediile de cultura.
- Face însămanţările şi efectuează antibiogramele.
- Face restul inregistrărilor.
- Măsoară pH-ul mediilor.

10. ÎNREGISTRĂRI

- Caiet de control intern microbiologie
- Caiet pentru prepararea mediilor de cultură
- Caiet de sterilizare
- Caiet de monitorizarea sterilizării aotoclav-sterile
- Caiet de monitorizarea sterilizării aotoclav-infecte
- Fişă de monitorizare a condițiilor de mediu

11. ANEXE

Nu este cazul.

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf. Parascheva„
Iaşi
Laboratorul de analize medicale

FIŞA PENTRU MONITORIZAREA CURĂŢENIEI ŞI DEZINFECŢIEI

Etaj , parter si casa scarilor

Luna…….

Activitatea/Data	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Spalare, dezinfectie pavimente																															
Spalare, dezinfectie suprafete – zone de contact(altele dcat mesele de lucru)																															
Spalare, dezinfectie grupuri sanitare																															
Spalare, dezinfectie usi, geamuri, pereti,																															
Curatenie generala																															
Eliminarea infectelor																															

Se semneaza cu initiale in casuta aferenta datei in care s-a efectuat activitatea MV-Meauca Viorica IM-Ivan Maria

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
" Sf. Parascheva„
Iasi
Laboratorul de analize medicale

PLAN DEZINFECŢIE ŞI CURĂŢENIE

Activitatea	Ziua							Materiale	Responsabil
	L	M	M	J	V	S	D		
Curatare, spalare, dezinfectie pavimente	Da	Da	Da	Da	Da	-	-	-Matura -Mop cu coada -Galeata mop -Lavete de bumbac -Apa -Surfanios citron- solutie de lucru	Ingrijitor : -Viorica Meauca –Maria Ivan
Curatare spalare, dezinfectie suprafete – zone de contact	Da	Da	Da	Da	Da	Mese de lucru	Mese de lucru	-Lavete de bumbac -Ventisept-spray- -Apa	Asistent compartiment de lucru
Curatare spalare, dezinfectie grupuri sanitare	Da	Da	Da	Da	Da	-	-	-Perie cu coada si stativ -Bureti pt lavoare -Detartrant Nufar, etc. - Surfanios citron- solutie de lucru	Ingrijitor : -Viorica Meauca –Maria Ivan
Spalare, dezinfectie usi, geamuri	-	-	-	-	-	Da lunar	-	-Lavete de bumbac -Spray alcoolizat pt. ferestre tip Rivex, etc -Apa si sapun(rame ferestre) -Subst. de curatare tip Cif, etc -Surfanios citron- solutie de lucru	Ingrijitor : -Viorica Meauca –Maria Ivan
Curatenie generala	Trimestrul I		Trimestrul II		Trimestrul III		Trimestrul IV	-Perii pentru pereti cu tija lunga -Perii pt. pardoseli -Matura -Mop cu coada -Galeata mop -Lavete de bumbac -Apa -Surfanios citron- solutie de lucru -Spray alcoolizat pt. ferestre tip Rivex, etc	Ingrijitor : -Viorica Meauca –Maria Ivan
Eliminarea infectelor	Da	Da	Da	Da	Da	-	-	Cutii de carton cu saci de PVC, cu simbol « Pericol biologic »	Ingrijitor : -Viorica Meauca –Maria Ivan

Nota:

1. Spalarea, dezinfectia suprafetelor de lucru se realizeaza la inceputul si sfirsitul lucrului.
2. Produsele de curatat se vor folosi conform Fiselor tehnice sau instructiunilor de utilizare

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA OPERATIONALA

NORME DE CURATENIE, DESINFECTIE SI ELIMINAREA DESEURILOR INFECTIOASE

COD : POL – 01

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager General
Prof. Dr. Carmen Dorobăţ

VERIFICAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

Elaborat:
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborila

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager General	1.		Prof.Dr. Carmen Dorobăţ					
Manager Tehnic	2		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Microbiologie I	3.		Conf. Dr. Olivia Dorneanu					
Sef compartiment Microbiologie II	4.		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Imunologie	5.		Dr. Cristina Petrovici					
Sef compartiment Hematologie	6.		Dr. Denisa Covaciuc					
Sef compartiment Biochimie	7.		Chim prin. Valentina Holban					
Sef compartiment biologie moleculara	8.		Dr. Aida Bădescu					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1. SCOP 5
2. DOMENIUL DE APLICARE 5
3. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ 5
5. DESCRIEREA ACTIVITĂŢILOR 6

4.1.Metode generale de efectuare a curăţeniei 6
4.2. Decontaminarea şi pregătirea materialului medico-chirurgical 6
4.3. Deşeurile rezultate din activităţile medicale 6
4.4. Dezinfecţia 7
4.5. Sterilizarea 7

6. RESPONSABILITATI 10
7. ÎNREGISTRĂRI 10
8. ANEXE 10

1.SCOP

Procedura stabileste norme privind curatenia, dezinfectia si eliminarea deseurilor infectioase astfel incat sa se minimalizaze riscurile contaminarii incrucisate in **Spitalul Clinic de Boli Infecţioase"Sf.Parascheva„ Iaşi,** Laborator de analize medicale.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Prezenta procedura se aplica de catre intregul personal al **Spitalul Clinic de Boli Infecţioase"Sf.Parascheva„ Iaşi,** Laborator de analize medicale in vederea respectarii cu strictete a nomelor de curatenie, dezinfectie si eliminare a deseurilor infectioase cu sarcini precise pentru tot personalul si pentru fiecare categorie de activitate:

- curatenia si dezinfectia suprafetelor
- curatenia si desinfectia echipamentelor
- programare in timp si spatiu a eliminarii deseurilor infectioase
- masuri de protectie in caz de accident

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

3.1. **MANUALUL CALITATII** , Cod: MCL – 01

3.2. SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;

3.3. Ordin MSF 1226/2012 pentru aprobarea normelor tehnice privind gestionarea deseurilor reyultate din activitatile medicale

3.4. Ordin MSF 195/2003 privind aprobarea normelor tehnice privind curatenia, desinfectia, efectuarea sterilizarii si pastrrea sterilitatii obiectelor si materialelor sanitare in unuitatile de stat si private

4. DEFINITII SI ABREVIERI

4.1. Definiţii

- Curatenia – este metoda de decontaminare care asigura indepartarea microorganismelor de pe suprafete, obiecte sau tegumante, o data cu indepartarea prafului si a substantelor organice

- **Dezinfectia** – este procesul prin care sunt distruse cele mai multe sau toate microorganismele patogene (in proportie de 99,99%), cu exceptia sporilor bacterieni de pe obiectele din mediul inert

- **Deseuri periculoase** – deseuri rezultate din activitatile medicale care constituie risc real pentru sanatatea umana si pentru mediu si care sunt generate in cursul activitatiolor de diagnostic

4.2. Abrevieri
Nu e cazul

5. DESCRIEREA ACTIVITATII

5.1. Curatenia
Aplicarea rationala a metodelor de curatenie a incaperilor, suprafetelor si obiectelor poate realiza o decontaminare de 95 – 98%, foarte apropiata de cea obtinuta dintr-o dezinfectie eficace.
Curatenia are avantajul ca actioneaza asupra tuturor microorganismelor.
Metodele folosite pentru curatenie sunt: spalarea, stergerea, aspirarea, perierea etc

Spalarea
Spalarea consta in antrenarea prin udare si indepartarea pulberilor si substantelor organice. Puterea de apalare depinde de capacitatea de udare. Spalarea se realizaeza prin folosirea de apa calda si substante tensioactive. Spalarea trebuie urmata de clatire abundenta.

Stergerea
Stergerea umeda a suprafetelor (lambriuri, mobilier, etc) realizeaza indepartarea microorganismelor. Se utilizeaza pentru mentinerea curateniei in intervalele dintre spalari.
Conditii de eficacitate a stergerii:
- utilizare de carpe (stergatoare) curate
- umezirea lor cu solutii cu detergent proaspete
- schimbarea fercventa a carpelor si apei de stergere
- dezinfectia si uscarea carpelor si a recipientelor dupa folosire

Alte metode de curatenie: se poate efectua maturatul sau periatul umed dar sunt metode cu eficacitate redusa.
Nu se recomanda maturatul uscat sau scuturatul in incaperi.
Curatenia in incaperi trebuie intotdeauna asociata cu aerisirea.
Ustensilele si materialele de curatenie se depoziteaza in conditii ingienice.
Curatenia eset utilizata in mod obisnuit ca metoda de decontaminare profilactica.

5.2. Dezinfectia

Este metoda de decontaminare prin care se urmareste distrugerea in proportie de 99,99% in mediul fizic inconjurator a formelor vegetative a microrganismelor in scopul prevenirii infectiilor. Dezinfectia se aplica in cazurile in care curatenia nu elimina riscul de raspandire a infectiei iar sterilizarea nu este necesara.

In orice activitate de dezinfectie trebuie sa se aplice masurile de protectie a muncii pentru a preveni accidentele si intoxicatiile.

Dezinfectia in laborator utilizeaza in principal agenti chimici, substante cu efect antimicrobian nespecific (**dezinfectant** – substanta aplicata numai pe suparafete inerte – este toxica si iritanta; **antiseptic** – poate fi aplicat pe tegument, mucoase, plagi).Uneori aceeasi substanta in solutie diluata este antiseptic, iar in solutie mai concentrata este dezinfectant.

Decontaminarea echipamentelor medicale si a suprafetelor de lucru intra in resposabilitatea peronalului autorizat pentru expolatarea echipamentelor si a asistentilor responsabili cu faza preanalitica.

Personalul care utilizeaza in mod curent dezinfectantele este instruit cu privire la utilizarea si gestionarea substantelor dezinfectante, precum si in ceea ce priveste masurile de protectie a muncii si de prim ajutor.

5.3. Efectuarea curateniei si dezinfectiei

In **Spitalul Clinic de Boli Infecţioase"Sf.Parascheva„ Iaşi,** Laborator de analize medicale curatenia se efectueaza zilnic la sfarsitul activitatii. Personalul care realizeaza curatenia poarta halat si manusi de unica folosinta, deoarece vine in contact cu produse biologice potential infectioase. Dupa curatenie se va efectua dezinfectarea suprafetelor de lucru a podeleleor si a peretilor cu substante antiseptice (ex. Incidur).

Operatiile de curatenie si dezinfectie sunt inregistrate in Graficul de efectuare a curateniei si dezinfectiei, cod FOL-01-01.

Regula de zi cu zi este ca in laborator sa existe in mod permanent ingrijitoare – femeie de serviciu. Ingrijitoarea poate interveni intr-un sector de lucru in timpul programului de laborator, dar numai la cererea si sub supravegherea responsabilului de analiza care decide intinderea si regulile interventiei de curatenie. De exemplu, spargerea unei eprubete sau flacon pe paviment, rasturnarea unui recipient, etc. In acest caz este esential ca ingrijitoarea sa nu faca decat ceea ce i se cere in mod expres. Se are in vedere prevenirea contaminarii probelor biologice aflate in sectorul de lucru (nu se pot folosi pulverizatori, aspirator etc)

Igienizarea, curatenia si dezinfectia in cadrul **Spitalului Clinic de Boli Infecţioase" Sf. Parascheva„ Iaşi,** Laboratorul de analize medicale se realizeaza in baza unui program elaborat de Seful de laborator in conformitate cu cerintele normelor sanitare si antiepidemiologice in vigoare, Plan de curatenie si dezinfectie, cod FOL-01-02. Programul include masuri si lucrari cu frecventa zilnica, saptamanala si lunara, precum si responsabilitatile pentru curatenie si control.

Zilnic se va efectua :

- paviment : maturare umeda, spalare cu detergent, dezinfectie
- pereti verticali (zona de contact cu mainile): spalare cu detergent, dezinfectie
- holuri : maturare umeda, spalare cu detergent, dezinfectie
- grupuri sanitare : spalare cu detergent, dezinfectie

Saptamanal se va efectua spalarea cu detergent si dezinfectia usilor, peretilor, geamurilor.
Lunar se va efectua spalarea cu detergent si dezinfectia plafoanelor si corpurilor de iluminat.

In functie de tipul dezinfectantelor folosite se iau masuri specifice de precautie pentru evitarea accidentelor astfel :

- substantele dezinfectante se folosesc numai pentru suprafetele pentru care sunt indicate
- in functie de natura substantei dezinfectante se evita contactul cu pielea, mucoasele, ochii; in caz de accident se spala din abundenta cu apa
- produsii pe baza de diclorizocianurat de sodiu sunt utilizati pentru dezinfectia generala a suprafetelor, dezinfectia suprafetelor murdare, a instrumentarului, pipete, ustensile de laborator, dezinfectie HIV
- diclorizocianatul este un oxidant puternic, nu este conbustibil, dar mareste combustia altor substante reactionand violent cu acestea si favorizand producerea focului si a exploziei ; substanta se descompune la caldura, iar in contact cu apa provoaca vapori de monoxid de carbon si emisie de clor ; produsii sunt iritanti pentru piele si ochi, cai respiratorii, iar ingestia produce efecte caustice asupra tubului digestiv
- in timpul manipularii sunt interzise : consumul de alimente, bauturi, fumatul
- in timpul lucrului se foloseste echipament de protectie : halat, manusi, masca

Pentru verificarea eficientei curateniei si dezinfectiei se executa lunar control bacteriologic pentru aer, suprafete si podele.

5.4. Eliminarea deseurilor infectioase

5.4.1. Tipuri de deseuri

Deseurile rezultate din activitatile medicale pot fi deseuri periculoase sau nepericuloase.
Deseurile nepericuloase sunt deseurile asimilabile celor menajere. In amestec cu deseurile periculoase, aceste inceteaza de a mai fi nepericuloase. Din aceasta categorie fac parte : ambalajele materiale sterile, hartia, sacii si alte ambalaje din material plastic, recipiente care nu au venit in contact cu sangele sau cu alte produse patologice biologice.

Deseurile periculoase sunt reprezentate de :

- deseuri infectioase: deseuri care au venit in contact cu sangele ori cu alte fluide biologice (ex. Seringi, ace, recipiente care au continut sange sau alte lichide biologice, manusi, comprese, alte materiale de unica folosinta, materiale de laborator folosite)

- deseuri intepatoare- taietoare : ace, seringi cu ac, sticlarile de laborator sau alta sticlarie sparta care a venit in contact cu material infectios
- deseuri chimice : includ recipientii care au continut reactiv si substante folosite in laborator, substante cu termen de valabilitate folosit

Gestionarea deseurilor provenite de la laboratorul medical se face conform cerintelor ordinului MSF 1226/2012.

5.4.2. Identificarea si colectarea selectiva a deseurilor la locul de producere

5.4.2.1. Colectarea si separarea deseurilor in sectorul de recoltare a probelor

Ambalajul seringilor, acelor, vacutainerelor, bandajelor adezive, prosoapele de hartie se colecteaza in container de gunoi menajer, cu sac colector manajer de culoare neagra si sunt depozitate in tomberonul cin incinta laboratorului de analize medicale de unde vor fi ridicate de serviciul de salubritate

Acele de la seringi sau de la sistemul vacutainer sunt colectate in containere avizate de catre MS pentru deseuri medicale intepatoare cu pereti rezistenti si sistem de extragere automata a acului.

Seringile si tampoanele, manusile de unica folosinta sunt colectate in saci de plastic galbeni, inscriptionati cu semnul « Pericol biologic », asezati in containere de inox, cu pedala, inscriptionate cu simbolul « Pericol biologic ».

5.4.2.2. Colectarea si separarea deseurilor in compartimentele laboratorului

Ambalajele de hartie, pungile de plastic, cutiile de carton care nu au venit in contact cu produsele biologice se colecteaza in containere de gunoi, cu saci menajeri negrii si vor urma acelasi circuit cu deseurile menajere.

Materialele de laborator de unica utilizare, varfuri, cuvite de ser, baghete de plastic, godeuri sunt colectate in vase cu solutie dezinfectanta aflate pe masa de lucru, in care sunt imersate complet minim o ora, dupa care sunt colectate in saci de polietilena galbeni speciali, avand inscriptia « Pericol biologic » si pusi in containere cu pereti rigizi din inox sau plastic, cu pedala, de asemenea inscriptionati cu simbolul « Pericol biologic ».

Probele de sange, urina sau materii fecale, dupa testare, fragmentele de tesuturi din tuburile colectoare sunt colectate in saci special galbeni inscriptionati cu semnul « Pericol biologic », asezati in containere de inox, cu pedala, inscriptionate cu simbolul « Pericol biologic ».

5.4.2.3. Transportul deseurilor la spatiul de colectare a deseurilor

Deseurile periculoase colectate in saci si cutii rezistente, perfect inchise si inscriptionate cu simbolul « Pericol biologic » sunt puse in containerul destinat transportului care este rigid, rezistent, cu capac ce se inchide etans, de asemenea inscriptionat cu simbolul « Pericol biologic » si transportate la spatiul de depozitare a deseurilor de la nivelul spitalului.

6. RESPONSABILITATI

6.1. Managerul General

- asigura resursele materiale si financiare pentru realizarea activitatilor de igienizare, dezinfectie, gestionare deseuri

6.2. Şeful de Laborator

- instruieste personalul din subordine referitor la responsabilitatile privind igienizarea, dezinfectia, gestionarea deseurilor
- raspunde de implementarea prezentei proceduri in toate compartimentele laboratorului
- stabileste necesarul de materiale pentru curatenie, dezinfectie, colectarea deseurilor
- receptioneaza materialele achizitionate pentru curatenie, dezinfectie, colectarea deseurilor
- verifica implementarea prezentei proceduri

6.3. Responsabilul Calităţii

- verifica in cadrul auditurilor interne implementarea prezentei proceduri

7. INREGISTRARI

Grafic de efectuare a curateniei si dezinfectiei, cod : FOL - 01-01
Plan de curatenie si dezinfectie, FOL - 01-02 ;

8. ANEXE

Anexa 1 – Grafic de efectuare a curateniei si dezinfectiei, cod : FOL - 01-01
Anexa 2 - Plan de curatenie si dezinfectie, FOL - 01-02

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase”Sf. Parascheva,, Iaşi
Laboratorul de analize medicale

Fişă pentru raportarea incidentelor în laborator

Compartimentul	Descrierea incidentului	Analiza cauzelor	Acţiuni de remediere	Recomandări pentru prevenirea incidentelor similare	Acţiuni întreprinse pentru implementarea recomandărilor	Şef laborator

Fişă pentru raportarea incidentelor în laborator

Compartimentul	Descrierea incidentului	Analiza cauzelor	Acţiuni de remediere	Recomandări pentru prevenirea incidentelor similare	Acţiuni întreprinse pentru implementarea recomandărilor	Şef laborator

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA OPERATIONALA

BIOSIGURANTA IN LABORATORUL DE ANALIZE MEDICALE

Cod : POL – 02

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager General
Prof. Dr. Carmen Dorobăţ

VERIFICAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

Elaborat:
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborila

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager General	1.		Prof.Dr. Carmen Dorobăţ					
Manager Tehnic	2		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Microbiologie I	3.		Conf. Dr. Olivia Dorneanu					
Sef compartiment Microbiologie II	4.		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Imunologie	5.		Dr. Cristina Petrovici					
Sef compartiment Hematologie	6.		Dr. Denisa Covaciuc					
Sef compartiment Biochimie	7.		Chim prin. Valentina Holban					
Sef compartiment biologie moleculara	8.		Dr. Aida Bădescu					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1.SCOP.....5

2. DOMENIUL DE APLICARE.....5

3. DOCUMENTE DE REFERINTA.....5

4. DEFINITII SI ABREVIERI.....5

4.1. DEFINIŢII.....6

4.2. ABREVIERI.....**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

5. DESCRIEREA ACTIVITATII.....**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

6. RESPONSABILITATI.....7

7. INREGISTRARI.....7

8. ANEXE.....7

1.SCOP

Procedura stabileste riscul microbiologic, tinand cont de urmatorii factori:

- patogenitatea agentului infectios si doza infectanta
- consecintele posibile ale expunerii
- calea naturala de infectare
- alte cai de transmitere, rezultate in urma manipularii in laborator (parenterala, aeriana, ingerare)
- stabilitatea agentului infectios in mediul extern
- concentratia gentului infectios si volumul de material ce se manipuleaza
- accesul efectiv la masuri profilactice sau terapeutice eficace

2. DOMENIUL DE APLICARE

Prezenta procedura se aplica de catre Laboratorul de analize medicale al **Spitalul Clinic de Boli Infecţioase" Sf.Parascheva„ Iaşi,** in vederea respectarii cu strictete a nomelor de biosiguranta, in conditiile in care laboratoarele de analize medicale se incadreaza in nivelul de biosiguranta 2 si peste.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

3.1. **MANUALUL CALITATII**, Cod: MCL – 01

3.2. SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;

3.3. Ordin MSF 1226/2012 pentru aprobarea normelor tehnice privind gestionarea deseurilor reyultate din activitatile medicale

3.4. Ordin MSF 195/2003 privind aprobarea normelor tehnice privind curatenia, desinfectia, efectuarea sterilizarii si pastrrea sterilitatii obiectelor si materialelor sanitare in unuitatile de stat si private

3.5. Ghid National de Biosiguranta in Laboratoarele Medicale

4. DEFINITII SI ABREVIERI

4.1. Definiţii

- **Deseuri periculoase** – deseuri rezultate din activitatile medicale care constituie risc real pentru sanatatea umana si pentru mediu si care sunt generate in cursul activitatiolor de diagnostic

4.2. Abrevieri

Nu e cazul

5. DESCRIEREA ACTIVITATII

5.1. Protecţia pacienţilor şi a personalului din laborator

La intrarea în laborator nu există denivelări, materiale sau echipamente pentru construcţii care pot determina producerea de accidente, iar în interiorul laboratorului, precum şi în facilităţile pentru pacienţi, nu există obiecte instabile sau tăioase care să genereze accidente.

Accesul în laborator este reglementat, la intrarea în laborator existând avertizări scrise pentru pericol biologic.

Există semne de avertizare pentru pericol biologic pentru identificarea următoarelor materiale contaminate :

- containere utilizate pentru a depozita sau transporta materiale contaminate
- containere utilizate pentru a depozita sau transporta deşeuri medicale obişnuite
- frigidere şi congelatoare în care se depozitează materiale potenţail infecţioase (tulpini de referinţă)

În zonele de lucru unde se poate produce infecţia cu sânge sau cu lichide organice există chiuvete pentru spălarea mâinilor, antiseptce, prosoape curate.Chiuvetele utilizate pentru spălarea mâinilor nu sunt folosite pentru aruncarea sângelui şi a lichidelor organice.

Personalul care lucrează în laborator se spală pe mâini imediat după contactul efectiv sau posibil cu sânge, lichide organice sau alte materiale organice, chiar dacă poartă mănuşi.

Pentru îndepărtarea obiectelor ascuţite există containere etanşe, rezistente la perforare, etichetate, iar angajaţii sunt instruiţi să nu umple excesiv containerele în care sunt depozitate obiecte ascuţite

În laborator este interzisă consumarea alimentelor, băuturilor, aplicarea cosmeticelor, manipularea lentilelor de contact; în spaţiile unde se păstrează sânge şi alte materiale potenţial infecţuioase este interzisă depozitarea alimentelor şi băuturilor pentru consum, acestea depozitându-se într-un frigider desemnat special.

Recoltarea probelor biologice de sânge se realizează cu ajutorul unui sistem de unică utilizare, alcătuit din seringă sterilă de unică utilizare, cu termen de valabilitate neexpirat sau holder şi eprubetă sterilă de unică utilizare, deferenţiate în funcţie de analiza solicitată. Recoltarea probelor de urină sau coprologice se realizează utilizând recipiente speciale, de unică utilizare, cu termen de valabilitate neexpirat.

Personalul este protejat prin purtarea halatului şi a mănuşilor de unică utilizare în timpul lucrului. Îmbrăcămintea de protecţie este scoasă la ieşirea din spaţiul de lucru al laboratorlui. Obiectele proprietate personală şi hainele sunt păstrate în vestiare.

În compartimentul Microbiologie există o hotă cu flux laminar.
Personalului care lucrează cu sau care manipulează sânge uman li se asigură vaccinarea împotriva hepatitei B.
În laborator există echipamente adecvate pentru stingerea incendiilor. Personalul din laborator este instruit cu privire la :

- recunoaşterea şi evaluarea riscurilor de incendii ;
- măsurile necesare pentru reducerea riscului de incendii ;
- acţiunile care trebuiesc întreprinse în momentul izbucnirii unui incendiu.

5.2 Măsuri de prim ajutor

5.2.1.Inteparea, taierea, zgarierea, abraziunea accidentala

- considera ca fiind un risc de expunere semnificativ orice leziune cu corpuri ascutite, taioase, chiar daca nu sunt urme de sange vizibile la locul leziunii si tegumentul nu pare a fi fost lezat serios
- spala imediat abundant zona afectata cu un jet de apa, apoi cu apa si sapun
- dezinfecteaza zona cu un antiseptic activ, efficient, poaspat preparat; aplica in pansament steril daca este necesar
- raporteaza incidental sefului de laborator si medicului epidemiolog-infectionist

5.2.2 Contactul accidental cu material infectios

Categoria include orice contact neprotejat al tegumentului prezentand solutii de continuitate, a mucoasei bucale, nasale sau a globului ocular cu material potential infectios.

- spala abundant imediat zona tegumentara cu jet de apa si sapun; foloseste doar apa pentru cavitatea bucala si, respective, ser fiziologic steril pentru globii oculari
- raporteaza imediat incidental sefului de laborator si medicului epidemiolog-infectionist

5.2.3.Actiuni immediate dupa expunerea accidentala

Indiferent de potentialii agenti microbieni patogeni continuti de materialul infectios implicat in expunerea accidentala potential infectanta se impugn cateva masuri immediate:

- se va preleva o proba de sange de la accidentat pentru testari de baza (afirmarea/infirmarea unor infectii preexistente cu accidentului cu etiologie HBV+/-HDV, HCV, HIV, Treponema pallidum etc)
- o contraproba de ser se va pastra in congelator pentru investigatii suplimentare
- se va preleva (daca e posibil) o proba de sange de la subiectul de la care provine materialul biologic, potential infectios (teste paralele cu accidentatul)

Ratiunea pentru care se fac aceste prelevari este:

- a stabili caracterul orrect ure /neprofesional al unei/unor imbolnaviri ulterioare
- a se adopta o atitudine terapeutica imediata, rationala si eficienta fata de accidentat
- a stabili durata de urmarire/supraveghere clinica si de laborator a accidentatului (in general pe durata maxima de incubatie a agentului/agentilor infectiosi potentiali/reali existenti in materialul infectios implicat in accident)

In cursul investigarii unei izbucniri epidemice trebuie stabilite proceduri adecvate specifice de preventie si tratament si de urmarire pe durata maxima de incubare (pentru agentul etiologic incriminat) a personalului implicat in actiune.

In cursul unei izbucniri epidemice suspectate de a fi o febra hemoragica, personalul implicat in investigarea focarului va fi monitorizat de doua ori pe empera de trei saptamani privind starea generala si orrect ure.

Daca un detaliu procedural este identificat drept cauza generatoare a accidentului este necesar sa se intreprinda o actiune corectiva.

5.3. Decontaminare, curăţenie şi dezinfecţie după vărsarea unui produs

În toate zonele unde se pot produce scurgeri de lichide există o trusă adecvată pericolelor biologice pentru scurgeri de lichide.
Se poartă mănuşi, halat şi protecţie pentru faţă. Mănuşile vor fi groase, rezistente la perforare.

Dacă scurgerea conţine sticlă spartă sau alte obiecte, acestea vor fi îndepărtate fără a folosi contactul cu mâinile. Se folosesc foi de carton rigide, cleşti, cupe de plastic de unică folosinţă. Obiectele folosite vor fi îndepărtate prin aruncare în containere adecvate unui pericol biologic, rezitente la perforare.

Dacă scurgerea este mare şi se pot contamina pantofii personalului, vor fi purtate învelitori de protecţie, impermeabile la apă.
Masa de lichid scursă trebuie absorbită înainte de contaminare. Lichidul scurs se absoarbe cu un material de unică folosinţă (hârtie, tampoane de tifon).

Decontaminarea se realizează prin acoperirea locului unde s-a produs scurgerea cu materiale de unică folosinţă, îmbibate în dezinfectant. Soluţia dezinfectantă se absoarbe cu materiale de unică folosinţă sau se poate lăsa să se usuce.

După absorbţia completă, decontaminarea şi uscarea zoneiunde s-a vărsat lichidul, urmează urăţarea acesteia. Se spală zona cu apă şi detergent, se usucă locul unde s-a produs scurgerea.

5.4. Biosiguranţa echipamentelor

Siguranta microbiologica a echipamentelor
In cursul utilizarii anumite echipamente pot genera pericole de contaminare microbiologica.

In Tabelul 1 sunt cuprinse echipamentele si operatiunile care pot genera pericole de contaminare microbiologica, precum si sugestii privind modul in care pot fi eliminate sau reduse aceste riscuri.

Tabel 1 Echipamente si operatiuni care pot genera pericole

Echipament	Riscul	Masuri de eliminare sau reducere a riscului
Ace de siringa	➢ Inoculare accidentala ➢ Aerosoli ➢ Stropire	➢ Nu reacoperiti acele si nu retezati acele ➢ Folositi seringa cu system tip baioneta de blocare a acului sau orrect de unica utilizare, la care acul este parte integranta a seringii, pentru a preveni detasarea acului de siringa ➢ Folositi tehnici corecte de laborator ➢ Umpleti siringa cu atentie pentru a reduce la minimum cantitatea de bule de aer sau formarea de spuma in inocul ➢ Evitati folosirea siringilor pentru a amesteca lichide infectioase; daca totusi le folositi asigurati-va ca varful acului este este imersat in lichid si evitati expulzarea din seringa cu forta excesiva ➢ Infasurati acul si amboul intr-un tampon de vata imbibat in dezinfectantul corespunzator inainte de a extrage acul din capacul/dopul de cauciuc al flaconului ➢ Eliminate excesul de lichid si bulele de aer tinand seringa vertical intr-un tampon de vata imbibat in dezinfectant sau intr-un flacon ➢ Efectuati toate operatiunile cu material infectios intr-o HSB ➢ Imobilizati animalele in timpul inocularii ➢ Folositi ace boante sau canule pentru inocularea intranazala sau orala ➢ Lucrati intr-o HSB ➢ Autoclavati acele de seringa dupa utilizare si asigurati-va ca evacuarea lor se face orrect. Daca acul siseringa nu formeaza un diopozitiv unitar, nu le dezasamblati inainte de autoclavare.
Centrifuga	➢ Aerosoli ➢ Stropire ➢ Spargerea cupelor	➢ Folositi cupe cu capac sau rotoare cu capac etans ➢ Deschide cupele sau rotoarel edupa ce aerosolii s-au depus (30 minute) sau in HSB

Ultracentrifuga	➢ Aerosoli ➢ Stropire ➢ Spargerea cupelor	➢ Instalati un filru HEPA intre cenrifuga si pompa de vid ➢ Inregistrati orele de functionare pentru fiecare rotor si respectati un program preventive de supraveghere a functionarii (service) pentru a reduce riscul unor defectiuni mecanice ➢ Umpleti si goliti cupele intr-o HSB
Exicatoare pentru anaerobioza	➢ Explozie ➢ Raspandire de materiale infectioase	➢ Asigurati-va de intregritatea capsulei din sarma din jurul catalizatorului
Desicatoare	➢ Impozie ➢ Dispersarea fragmentelor de sticla si a materialelor infectioase	➢ Asezati-le intr-o cusca rezistenta din plasa de sarma
Omogenizatoare Aparate pentru fragmentarea tesuturilor	➢ Aerosoli ➢ Scurgeri ➢ Spargeri ale containerului	➢ Efectuati operatiunile si deschideti echipamentul in HSB ➢ Folositi modele special concepute care previn scurgeri pe la garniturile pieselor rotative sau ale capacelor sau folositi aparate cu incinte etanse ➢ Inainte de a deschide omogenizatorul asteptati 30 min. pentru a permite aerosolilor sa se depuna. Refrigerarea condenseaza aerosolii ➢ Daca folositi un omogenizator manual infasurati tubul intr-un material absorbant
Sonicatoare Bai cu ultrasunete	➢ Aerosoli ➢ Tulburari auditive ➢ Dermatite	➢ Efectuati operatiunile si deschideti capacul in HSB ➢ Asigurati izolarea impotriva ultrasunetelor ➢ Utilizati manusi pentru a va proteja impotriva efectelor chimice ale detergentilor
Agitatoare pentru culturi Shakere Mixere	➢ Aerosoli ➢ Stropire si varsare	➢ Efectuati operatiunile in HSB sau in nise speciale ➢ Utilizati pentru culturi recipiente solide inchise etans, cu capac insurubat, prevazute cu filtre protectoare, daca este necesar, si bine securizate
Liofilizatoare	➢ Aerosoli ➢ Contaminare prin contact direct	➢ Utilizati filtre de aer pentru a proteja dispozitivul de vid ➢ Utilizati o metoda eficienta de decontaminare (ex. Chimica) ➢ Asigurati-va de existenta unor capcane pentru umezeala si a unui condensator de vapori ➢ Inspectati atent toate recipientele din sticla

		pentru vid pentru a observa zgarieturi sau crapaturi ➢ Utilizati numai sticlarie special concenputa pentru vid
Bai de apa	➢ Cresterea microorganismelor ➢ Formare de compusi explozivi ai azidei de sodiu cu anumite metale	➢ Asigurati curatarea si dezinfectia periodica ➢ Nu utilizati azida de sodium pentru a preveni cresterea microorganismelor

Pe langa riscurile microbiologice, riscurile produse de echipament trebuie anticipate si prevenite. Tabelul 2 prezinta cateva cause ale accidentelor generate de echipamente.

Tabel 2. Cauze mai frecvente ale accidentelor generate de echipamente

Accident	Cauza accidentului	Masuri de reducere sau eliminare a riscului
Concepere sau constructie gresite		
Fire electrice in incubatoare	Cresterea necontrolata a temperaturii	Respectarea standardelor nationale
Electrocutari	Impamantare gresita	Respectarea standardelor nationale
Utilizare improprie		
Accidente de centrifugare	Neechilibrarea cupelor	Instruirea si supravegherea personalului
Explozia incubatoarelor pentru anaerobioza	Utilizarea unui gaz corespunzator	Instruirea si supravegherea personalului
Adaptare improprie		
Explozie in recipiente sub vid de uz casnic	Transportul impropriu al azotului lichid	Utilizarea unui echipament coprespunzator
Explozie in frigidere de uz casnic	Chimicale periculoase depozitate in containere nerezistente la aprindere si explozii (ex. eter in recipient cu dop Insurubat care permite scurgerea)	Pastrarea solventilor si extractelor cu punct de aprindere scazut numai in frigidere si containere rezistente la aprindere si explozii

Intretinere incorecta		
Foc in flamfotometru	Incorecta reasamblare a componentelor cu ocazia reparatiilor si operatiunilor de intretinere	Instruirea si supravegherea personalului

6. RESPONSABILITATI

6.1. Şeful de Laborator si Responsabilii de Analiza

- raspunde de instruirea personalului privind biosiguranta in laborator ;
- supravegheaza respectarea instructiunilor din procedura ;

6.2. Responsabilul cu Securitatea

- implementează prezenta procedură
- verifică periodic existenţa trusei pentru cazurile în care există scurgeri de lichide

7. INREGISTRARI

- Fişă pentru raportarea incidentelor, cod:FOL - 02 - 01

8. ANEXE

Anexa 1 - Fişă pentru raportarea incidentelor în laborator, cod:FOL - 02 - 01

Spital Clinic de Boli Infectioase « Sf. Parascheva » Iasi

FISA CONTROL DE CALITATE AL ANTIBIOGRAMEI DIFUZIMETRICE PE TULPINI DE REFERINTA CONFORM CLSI

Data:.....

Nr. crt	Lot / Data expirarii	Microcom-primat	Concen-tratia U/micro-grame	*Escherichia coli* ATCC 25922		*Staphylococcus aureus* ATCC25923		*Pseudomonas.aeruginosa* ATCC 27853	
				Limite acceptabile (mm)	Rezultate obtinute (mm)	Limite acceptabile (mm)	Rezultate obtinute (mm)	Limite acceptabile (mm)	Rezultate obtinute (mm)
		AK Amikacina	30	**19-26**		**20-26**		**18-26**	
		AMC Amoxi-ac.clav	20/10	**18-24**		**28-36**			
		FEP Cefepim	30	**31-37**		**23-29**		**24-30**	
		CTX Cefotaxim	30	**29-35**		**35-31**			
		FOX Cefoxitin	30	**23-29**		**23-29**			
		CAZ Ceftazidim	30	**25-32**		**16-20**		**22-29**	
		CIP Ciproflox.	5	**30-40**		**22-30**		**25-33**	
		DA Clindamic.	2			**34-30**			
		CS Colistin	10	**11-17**				**11-17**	
		ERT Ertapenem	10	**29-36**		**24-31**		**13-21**	
		E Eritromic.	15			**22-30**			
		G Gentamicin	10	**19-26**		**19-27**		**17-23**	
		IMI Imipenem	10	**26-32**				**20-28**	
		MEM Meropen.	10	**28-34**		**29-37**		**27-33**	
		FT Nitrofurant.	300	**20-25**		**18-22**			
		NOR Norfloxacin	10	**28-35**		**17-28**		**22-29**	
		OX Oxacilin	1			**18-24**			
		TZP Piperac-tazobactam	100/10	**24-30**		**27-36**		**25-33**	
		TEC Teicoplam.	30			**15-21**			
		SXT Cotrimoxaz	25/23,75	**23-29**		**24-32**			
		VA Vancomicin	30			**17-31**			

Intocmit de:.....

FISA CONTROL DE CALITATE AL ANTIBIOGRAMEI DIFUZIMETRICE PE TULPINI DE REFERINTA CONFORM CLSI/NCCLS

Nr. crt	Microcomprimat	Concentratia U/micrograme	Escherichia .coli ATCC 25922		Stafilococcus .aureus ATCC25923		Pseudomonas.aeruginosa ATCC 25923	
			Limite acceptabile (mm)	Rezultate obtinute(mm)	Limite acceptabile (mm)	Rezultate obtinute(mm)	Limite acceptabile (mm)	Rezultate obtinute(mm)

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf. Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale

FISA CONTROL INTERN MEDII DE CULTURA

Nr. crt	Data	Genul/Specia	Caracteristici de cultura								Identificare microscopica	Identificare caractere biochimice								Identificare antigenica	Lucrat de:	Verificat de:
			Columbia sg	Chapman solid	Mc Conkey	CLED	Uriselect	Mueller-Hinton	ADCL	Alt mediu		Catalaza	Oxidaza	Coagulaza	TSI	Manita	Indol	Simons	Phe			

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA OPERATIONALA

GESTIONAREA TULPINILOR DE REFERINTA

Cod: POL - 05

EDITIA 1, REVIZIA 0

Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborila

Elaborat:
Sef laborator

Dr. Rodica Fântânaru

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Microbiologie I	2.		Conf. Dr. Olivia Dorneanu					
Sef compartiment Microbiologie II	3		Dr. Rodica Fântânaru					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1. SCOPUL 5
2. DOMENIUL DE APLICARE 5
3. DOCUMENTE DE REFERINTA 5
4. DEFINITII SI ABREVIERI 5
5. DESCRIEREA ACTIVITATII 5
6. RESPONSABILITATI 6
7. INREGISTRARI 7
8. ANEXE- NU SUNT 7

I. SCOP

TESTAREA:

1. SUSTINERII CRESTERII BACTERIENE PE MEDIILE DE CULTURA UTILIZATE
2. EFICACITATII MICROCOMPRIMATELOR CU ATB.

2.RECEPTIE

2.1 Examinati conformitatea etichetei materialului liofilizat cu cele din documentele de insotire.
2.2 Inspectati fiecare tub cu materialul liofilizat pentru conformitatea ambalajului, etanseitate.
2.3 Verificati conformitatea datelor produsului receptionat cu cele din comanda.

Nota: orice comanda trebuie sa contina cel putin numele furnizorului, codul produsului, denumirea si modul de prezentare al produsului comandat, cat si cantitatea ceruta.

2.4 Inregistrati in REGISTRUL DE RECEPTIE TULPINI DE REFERINTA (INVENTAR) datele referitoare la produs:

- Nume produs,
- Sursa (nume furnizor, nume fabricant),
- Cod furnizor,
- Cod intern,
- Data receptiei,
- Numar serie/lot de fabricatie,
- Cantiatea totala,
- Documente de calitate ce insotesc livrarea,
- Orice comentariu relevant (starea ambalajelor primare, secundare),
- Operator.

3.DEPOZITARE

- Stocheati produsul liofilizat la temperatura de 2-8°C pana la utilizare, in ambalajul secundar original.

4.STABILITATE

Produsul poate fi stocat pana la data inscrisa in certificatul de calitate (documentul ce insoteste livrarea).

5.TESTARE

Fiecarui lot de mediu preparat, trebuie sa i se faca controlul intern cu tulpini de referinta, inainte de intrebuintare. In cazuri de *urgenta,* cand mediile sunt preparate si utilizate in aceeasi zi, testarea eficacitatii se va face concomitent cu testarea probei.
Daca mediile de cultura se dovedesc necorespunzatoare, lotul de mediu trebuie eliminat si o noua proba testata pe alt lot de mediu.

Nota: un lot de mediu se refera la toate tuburile/placutele/recipientele cu medii preparate in acelasi timp si sterilizate in acelasi autoclav, folosind aceleasi conditii.

Atentie: Toate tulpinile folosite pentru controlul de calitate trebuie sa fie surse oficiale, autorizate:ATCC, NCTC.

Procedurile de preparare, stocare si folosire se fac in conformitate cu regulile procedurale de securitate.
Examinarea mediilor insamantate si inregistrarea rezultatelor se face de catre specialistul microbiolog.
Testele si mediile care se dovedesc necorespunzatoare la controlul calitatii sunt investigate si actiunile care se iau sunt documentate.

Controlul de calitate al sustinerii cresterii bacteriene pe mediile de cultura cuprinde:

5.1. Resuspendarea continutului liofilizat.

Indicatii privind deschiderea fiolelor cu material infectios liofilizat

Deschiderea fiolelor cu material infectios liofilizat trebuie facuta obligatoriu in camera de biosiguranta (cu atentie deoarece continutul poate fi sub presiune mai mica si intrarea brutala a aerului poate dispersa o cantitate din produs in atmosfera), urmand urmatoarele etape:

- Dezinfectati suprafata externa a fiolei;
- Prindeti fiola cu un material imbibat intr-un agent dezinfectant, pentru a proteja mainile in momentul ruperii fiolei;
- Faceti cu pila o fisura pe peretele fiolei, aproape de mijlocul ei;
- Deschideti fiola prin rupere de la nivelul fisurii sub compresa;
- Indepartati usor partea superioara a fiolei si tratati-o ca pe materialul contaminat (o depuneti in recipientul cu solutie dezinfectanta in cabinetul de biosiguranta);
- Adaugati usor in fiola 2-3 picaturi (0.2 mL) bulion nutritiv pentru resuspendarea continutului liofilizat (de exemplu cu o pipeta Pasteur), cu precautie pentru a nu atinge marginea fiolei;
- Asteaptati ca materialul liofilizat sa se resuspende;
- Extrageti produsul resuspendat, cu aceasi pipeta si transferati continutul intr-un singur tub cu mediul de cultura (pentru o buna dezvoltare a microorganismelor).

5.2. CULTIVARE pe mediul in care s-a facut si resuspendarea (bulion nutritiv):
- Utilizati un singur tub cu mediu de cultura adecvat fiecarui tip de tulpina (3 tuburi):

1. Staphylococcus aureus ATCC 25923
2. Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
3. Escherichia coli ATCC 25922

5.3. INCUBARE
- cele 3 tuburi cu mediul de cultura lichid insamantat cu tulpinile de referinta se incubeaza la 37± 1°C, 24 h.

5.4 INSAMANTAREA

- Insamantati din fiecare tub incubat cate o placa cu geloza sange.

- Incubati-o la 37°C, 24h.
- Verifica caracterele de cultivare specifice fiecarei tulpini de referinta in parte.
- Insamanteaza fiecare tulpina de referinta in geloza moale conditionata in tuburi. (12 tuburi pentru fiecare tulpina de referinta in parte).
- Pastreaza tuburile cu geloza moale, insamantate la 4°C.
- Subcultiva o data dintr-un tub de geloza moale pe medii de cultura adecvate fiecarei tulpini dupa cum urmeaza:
- pentru Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

a) ISTRATI - MEITERT - o placa;
b) AABTL – o placa,
c) Geloza sange, - o placa
d) TSI,
e) MIU,
f) CiTRAT.

- pentru Staphylococcus aureus 25933:

a) Geloza sange,
b) CHAPMANN,

- pentru Echerichia coli ATCC 25922:

a) MAC (Mac ConKey),
b) ADCL (Agar Dezoxicolat Lactoza),
c) geloza sange,
d) TSI (Triple Sugar Iron),
e) MIU (Mobilitate Indol Uree),
f) Simmons (citrat)

- Incubati la 37°C, 24h.
- Cititi si interpretati rezultatele in Fisa Control de Calitate al Antibiogramei Difuzimetrice pe Tulpini de Referinta Conform CLSI/NCCLS, cod: **FOL – 05 - 01**

Pentru testarea eficacitatii microcomprimatelor:

Respectati procedura specifica de testare a sensibilitatii la antibiotice prin metoda difuzimetrica, folosind pentru inoculul de 0.5 McFarland cele 3 tulpini de referinta in parte.

Testati urmatoarele microcomprimate de antibiograma:

- pentru Pseudomonas aureus ATCC 25923:
  - Penicilin,
  - Eritromicina – atentie la D-TEST
  - Clindamicina – atentie la D-TEST
  - Gentamicina,
  - Ciprofloxacin.

- pentru Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853:

- Gentamicina,
- Ciprofloxacin,
- Cefoperazona,
- Ofloxacin.

- pentru Echerichia coli ATCC 25922
  - Ampicilina,
  - Gentamicina,
  - Ofloxacin,
  - Ciprofloxacin,
  - Cefuroxin,
  - Acid nalidixic,
  - Amoxacilina + Acid Clavulanic

- Interpretati conform procedurii specifice,

6. INREGISTRARE

- Inregistrati datele obtinute in registrul pentru testarea microcomprimatelor.

7. Anexe

Anexa 1 - Fisa Control Intern Medii de Cultura, cod: FOL – 05 - 01
Anexa 2 - Fisa Control de Calitate al Antibiogramei Difuzimetrice pe Tulpini de Referinta conform **CLSI/NCCLS,** cod: FOL – 05 - 02
Anexa 3 –Fisa de evidenta tulpini de referinta cod: FOL- 05-03

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICA

COPROCULTURA

COD: PSL – M2 – 02

Editia 1, Revizia 0
Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager tehnic
Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborila

Elaborat:
Responsabil analiza
Dr. Rodica Fântânaru

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
RC	0.	01.05.2013	As.Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.	01.05.2013	Dr. Rodica Fântânaru					
Sef Compartiment	2.	01.05.2013	Dr. Rodica Fântânaru					
Responsabil analiza	3.	01.05.2013	Dr. Rodica Fântânaru					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

0. CUPRINS

CAPITOLUL

0 Scop

1 Domeniu de aplicare

2 Documente de referinţă

3 Definiţii şi abrevieri

4 Descrierea activitatii

5 Procedura de lucru

6 Controlul de calitate

7 Comunicare rezultate si valori de referinta

8 Surse de eroare

9 Responsabilitati

10 Inregistrări

1. SCOP ŞI DOMENIU DE APLICARE

Procedura descrie activităţile şi etapele, din Compartimentul de Microbiologie 2 (produse patologice din situusuri normal contaminate) privind prelucrarea MF în scopul stabilirii diagnosticului etiologic în sindromul diareic acut şi în TIA.
Procedura se aplică în cadrul Compartimentul de Microbiologie 2 al Laboratorului

2. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ

2.1. Manualul Calităţii Laboratorului, cod MCL-01,
2.2. SR EN ISO/CEI: 15189: 2007 - Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă
2.3. SR EN ISO/TR 22869 - Laboratoare medicale. Ghid pentru implementarea în laboratoare a ISO 15189 : 2003
2.4. SR EN ISO 15190 : 2005 - Laboratoare medicale. Cerinţe pentru securitate.
2.5. IC-03 Controlul de calitate în microbiologie
2.6. Ministerul Sănătăţii – Academia de Ştiinţe Medicale – Metode curente pentru analize de laborator clinic, Ed. medicală, Bucureşti, 1982
2.7. *Coprologie clinica*, Ed. Medicala, Bucuresti, 1974, I. Gherman
2.8. D. Buiuc, M. Neguţ, *Tratat de microbiologie medicală*, Editura Medicală, Bucureşti, 1999
2.9. *Microbiologie clinică* vol I, Ed. Didactică şi Pedagogică, RA Bucureşti 1998, D. Buiuc
2.10. *Metode de laborator vol II*, Academia de ştiinţe medicale, Comisia de Standardizare, Ed. Medicală, Bucureşti 1997
2.11. Manualul de recoltare a produselor biologice, cod:PGL – 5.4-1;
2.12. *Parazitologie medicală,* Ed. ALL, Bucureşti 1994, S.Rădulescu, A.Meyer
2.13. *Baze clinice pentru practica medicală vol IV,* Ed. Medicală, Bucureşti Prof.Dr.Doc. A.Păunescu-Podeanu
2.14. Metodologia anuală de supraveghere şi control a bolii diareice acute (BDA) şi holerei pentru sezonul iunie-noiembrie – Autoritatea de Sănătate Publică
2.15. D.Buiuc, M.Neguţ, *Tratat de microbiologie medicală*, Editura Medicală, Bucureşti, 2008

3. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI

3.1. Coprocultură: examen microbiologic al materiilor fecale
3.2. Antibiograma: test de laborator care evidenţiază rezistenţa sau sensibilitatea unui germen patogen (bacterie) la diferite antibiotice.
3.3 Izolare bacteriană: cultivarea bacteriilor pe medii de cultură agarizate prin epuizarea inoculului cu ansa
3.4. Primocultură: izolarea bacteriilor din prelevatele patologice
3.5. Cultură pură: cultură formată din descendenţii unei singure colonii rezulta-te după o epuizare a materialului microbian, care duce la creştere sub forma coloniilor bine izolate pe medii agarizate
3.6. Medii de cultură selective: conţin substanţe care inhibă dezvoltarea bacteriilor de contaminare a prelevatelor; pentru izolarea enterobacteriaceelor din prelevate contaminate există medii cu trei niveluri de selectivitate: slab selective care inhibă bacteriile Gram pozitive , moderat selective care inhibă pe lîngă bacteriile Gram pozitive şi o parte din bacilii Gram negativi comensali şi înalt selective care inhibă o gamă mai largă de bacterii comensale

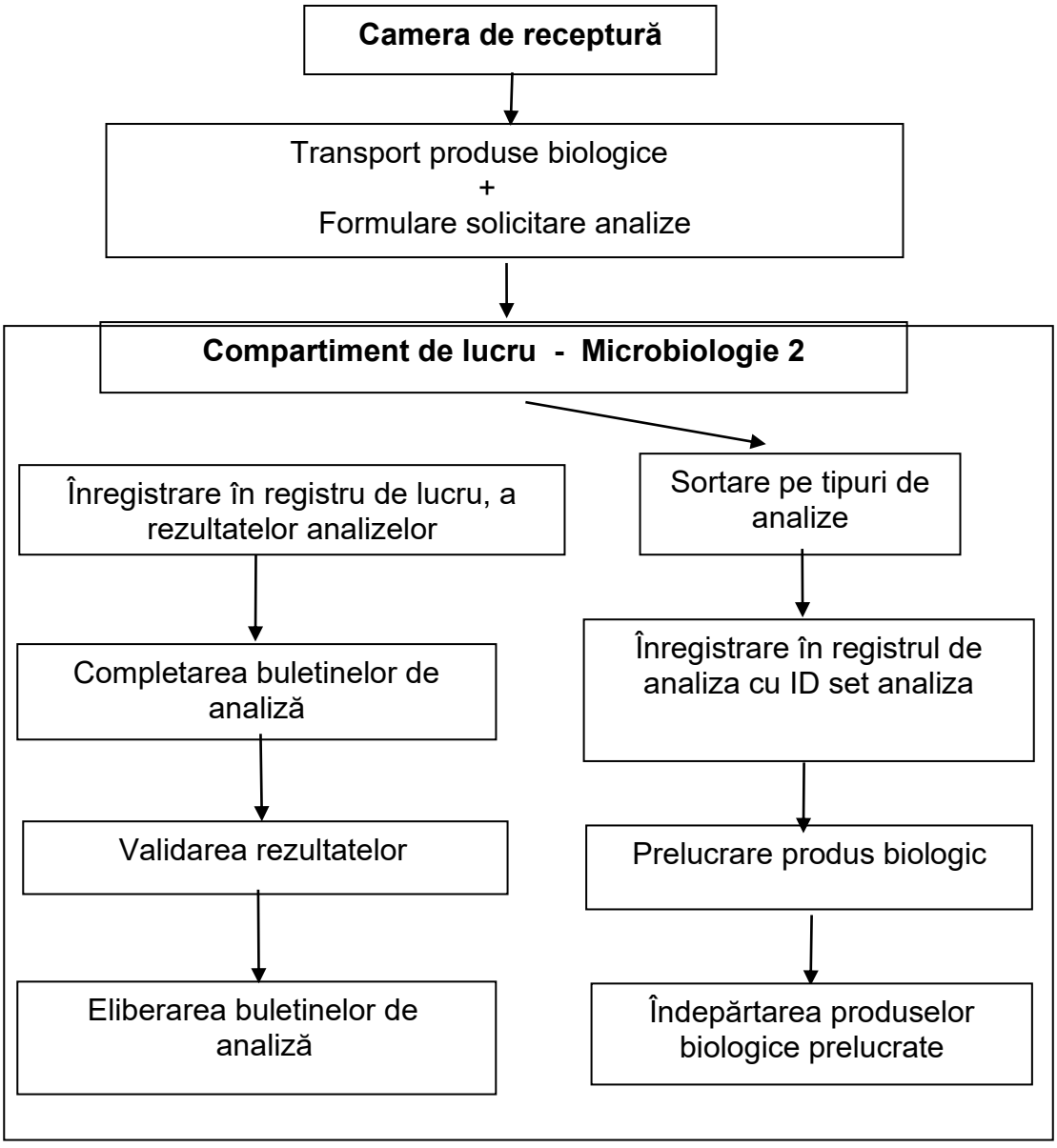
3.7. Medii de îmbogăţire: medii de cultură lichide care prin anumite substanţe inhibitoare, prelungesc faza de lag a bacteriilor de contaminare, fără a întârzia însă intrarea unor patogeni în faza exponenţială.
3.8. Medii diferenţiale: conţin substratul pentru o anumită enzimă bacteriană şi un indicator care atestă atacarea acestui substrat
3.9. Teste biochimice de identificare: teste care se efectuează pe medii speciale de identificare ce conţin anumiţi indicatori şi un substrat , care permit recunoaşterea unei bacterii pe baza activităţii sale biochimice şi identificarea preliminară a acesteia
3.10. Teste serologice (antigenice) de identificare: teste care se efectuează prin reacţii de aglutinare pe lamă sau latex aglutinare ce permit identificarea cu certitudine a unei specii bacteriene

3.2 Abrevieri:
UFC: Unităţi formatoare de colonii
ATCC: American Type Culture Collection
TSI: Triple Sugar Iron (glucoză, zaharoză, lactoză) – mediu de identificare multitest
ADCL: Agar deoxicolat citrat lactoză – mediu moderat selectiv de izolare a Enterobacteriaceelor
MC: Agar Mc Conkey – mediu slab selectiv de izolare a Enterobacteriaceelor
MC-sorb: Agar Mc Conkey cu sorbitol – mediu diferenţial pentru EHEC
AABTL: Agar albastru bromtimol lactoză – mediu diferenţial
WB: Mediul Wilson- Blair – mediu înalt selectiv izolare Salmonella typhi
CIN-Ye: Mediu selectiv de izolare Yersinia
TCBS : Mediu Taurocolat citrat bilă sucroză – mediu înalt selectiv de izolare Vibrio
BSA: Mediu Bilă sare agar – mediu moderat selectiv de izolare Vibrio
AP: Apă peptonată
AP-alc: Apă peptonată alcalină - mediu de îmbogăţire Vibrio
MK: Mediu Karmalli – mediu selectiv Campylobacter
AS: Mediu Agar sânge – mediu nutritiv
TIA: Toxiinfecţie alimentară
EPEC: Enteropatogen Escherichia coli
EHEC: Enterohemoragic Escherichia coli
LA: Latex aglutinare
SF: Ser fiziologic
AD: Apă distilată
MF: Materii fecale
BDA: Boală diareică acută
UV: Ultraviolete

4. DESCRIEREA ACTIVITĂŢII

Activitatea din cursul dimineţii începe prin examinarea culturilor bacteriene dezvoltate în ultimele 24-48 ore, repicarea coloniilor suspecte pe medii de identificare, interpretarea caracterelor biochimice şi identificarea caracterelor antigenice prin aglutinări pe lamă sau latexaglutinare a tulpinilor identificate, examinarea şi interpretarea antibiogramelor efectuate, toate datele fiind consemnate în registrul de analiza. Elaborarea diagnosticului de laborator cu consemnarea acestuia in registrul de analiza si pe formularul de solicitare, este urmata de introducerea lui in SIUI, validarea si eliberarea Buletinului de analiza.

După recepţionarea şi transportul produselor biologice la compartimentul de lucru, activitatea se desfăşoară conform schemei I:


Camera de receptură
Transport produse biologice
+
Formulare solicitare analize
Compartiment de lucru - Microbiologie 2
Înregistrare în registru de lucru, a rezultatelor analizelor
Completarea buletinelor de analiză
Validarea rezultatelor
Eliberarea buletinelor de analiză
Sortare pe tipuri de analize
Înregistrare în registrul de analiza cu ID set analiza
Prelucrare produs biologic
Îndepărtarea produselor biologice prelucrate

4.1.RESURSE NECESARE

4.1.a. Echipamente şi materiale de laborator

- autoclav
- termostat la 37°C şi 42°C
- etuvă
- microscop optic
- hotă cu flux laminar
- frigider(vitrină frigorifică)

- balanţă de precizie
- lampă cu UV
- pH-metru
- bec de gaz Bunsen
- scală nefelometrică McFarland
- lupă
- lame de microscop portobiect şi lamele
- cristalizor
- anse şi fir de însămânţare
- coprocultoare cu linguriţă colectoare şi capac înfiletat
- cutii Petri
- hârtie de filtru
- eprubete 10/10 şi 12/12
- pense
- sticluţe de 8ml
- pipete automate
- vârfuri pipete automate
- psipete/pipete Pasteur
- stative eprubete
- jar de 2,5 l pentru incubare în condiţii speciale
- containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile
- soluţii dezinfectante (soluţie clorinată şi amestec sulfocromic)
- recipiente pentru soluţii dezinfectante
- medii de cultură
- seruri de aglutinare pe lamă
- truse latex aglutinare
- truse pentru coloraţia Gram şi Ziehl Neelsen cu safranină
- soluţie Lugol
- coloranţi: albastru metilen şi verde malachit
- plicuri pentru incubare microaerofilă (Capygen) şi pentru anaerobioză
- reactivi adiţionali (reactiv Covaci şi reactiv Clorură ferică)
- discuri (benzi/ soluţie) pentru reacţia oxidazei
- perhidrol
- discuri pentru antibiogramă
- ser fiziologic
- ulei de cedru
- ulei de parafină
- parafină solidă

4.1.b. Materiale de referinţă

- tulpini de referinţă ATCC

Salmonella enterica ATCC 51812 TM
Shigella flexner ATCC 12022 TM
Yersinia enterocolitica ATCC 9610
Campylobacter jejuni ATCC 33291
E. Coli O157 H7 nontoxigenic strain NCTC 12900C 1967 I

4.1.c. RESURSE UMANE

- un medic
- doi asistenti de laborator

Măsuri de protecţie a personalului:
toate produsele biologice trebuie considerate potenţial infecţioase şi sunt recoltate şi manipulate conform regulilor de bioprotecţie.

4.2. PRODUSUL BIOLOGIC DE ANALIZAT : materiile fecale

Probele de MF sunt recoltate şi transportate la Laborator conform Manualului de recoltare a produselor biologice MRP-01 în intervalul orar 8^{00}-12^{00}; probele de MF prelevate în afara programului normal de lucru sunt depozitate în frigiderul de gardă (4-8°C), sunt recepţionate, înregistrate şi procesate la contravizită (dacă sunt aduse până la ora de începere a contravizitei), respectiv a doua zi dimineaţa (probe prelevate după încheierea programului de contravizită)

Modul de recepţionare, înregistrare şi transport al produselor biologice în Laborator se desfăşoară în conformitate cu MRP.

Criteriile pentru respingerea probei biologice sunt:
- recipient inadecvat
- lipsa mediului de transport
- cantitate insuficientă de produs biologic
- cantitate prea mare de produs biologic depasind nivelul de mediu de transport
- lipsa datelor de identificare de pe recipient
- lipsa formularului de solicitare

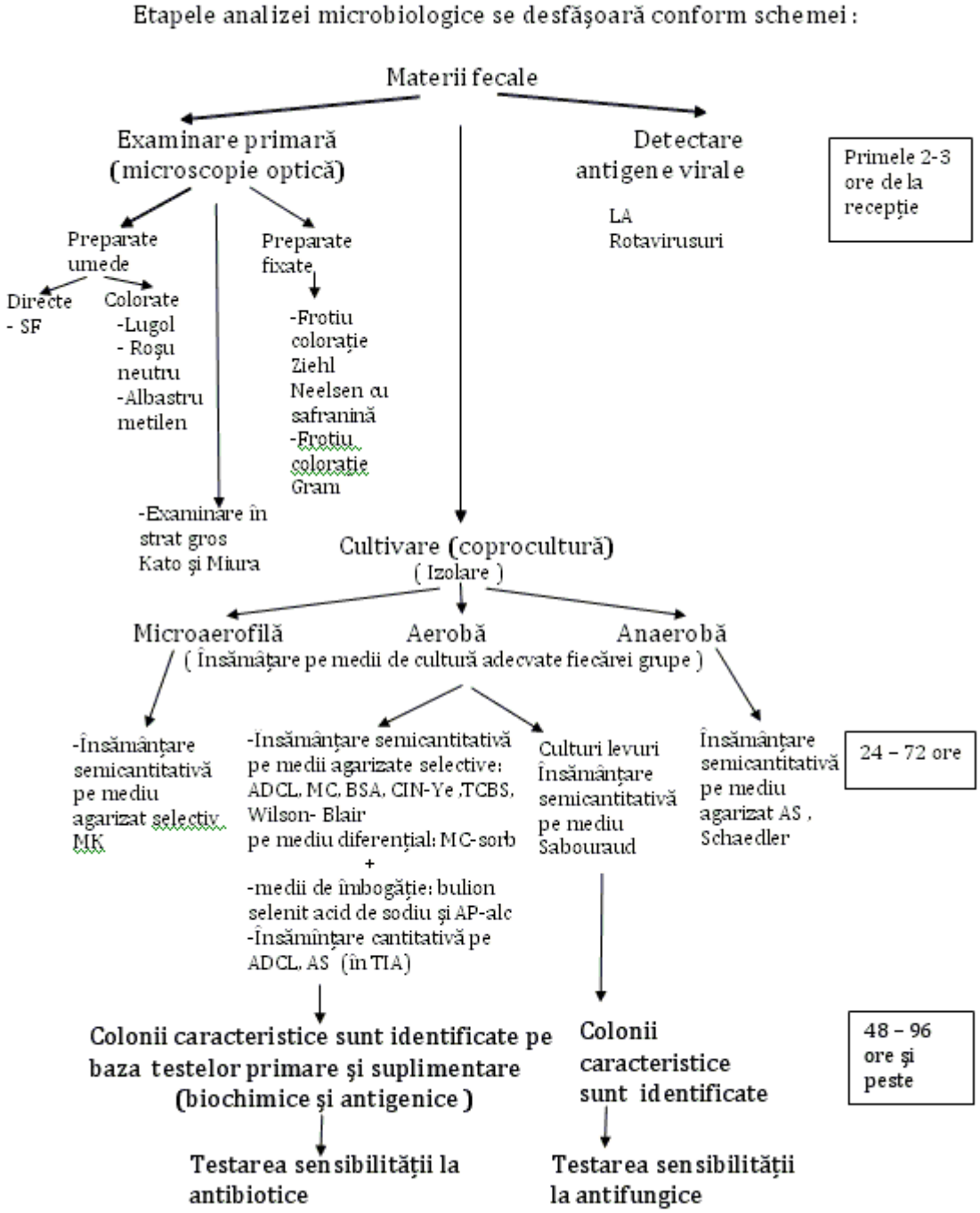
4.3. OPERAŢIUNI PREGĂTITOARE

Mediile de cultură, coloranţii sunt preparaţi conform instrucţiunilor de preparare, de către asistentul de laborator, în camera de preparare , sunt turnate în plăci Petri şi recipiente, în boxa de turnare medii , apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice.
Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticluţe, flacoane etc.) este pregătită pentru utilizare de către asistentul de laborator.
Materialele (plăci şi flacoane cu medii de cultură preparate) cât şi sticlăria (eprubete, sticluţe) sterilizate şi pregătite pentru utilizare, sunt aduse într-o cantitate estimată pentru 2-3 zile, de către asistentul de laborator ce deserveşte compartimentul de lucru , fiind depozitate în frigider (mediile de cultură) fie în cutii cu capac (eprubete, sticluţe, lame etc.).
Zilnic un număr estimat de plăci cu medii se pun la uscat în termostat înainte de utilizare şi se repartizează câte 2-3 ml mediu de îmbogăţire bulion selenit acid de sodiu, într-un număr estimat de sticluţe sterilizate.

4.4. ETAPELE ANALIZEI MICROBIOLOGICE

Etapele analizei microbiologice se desfăşoară conform schemei II

Schema II


Etapele analizei microbiologice se desfăşoară conform schemei:
Materii fecale
Examinare primară (microscopie optică)
Detectare antigene virale
LA
Rotavirusuri
Primele 2-3 ore de la recepţie
Preparate umede
Preparate fixate
Directe - SF
Colorate -Lugol - Roşu neutru -Albastru metilen
-Frotiu coloraţie Ziehl Neelsen cu safranină -Frotiu coloraţie Gram
-Examinare în strat gros Kato şi Miura
Cultivare (coprocultură) (Izolare)
Microaerofilă
Aerobă
Anaerobă
(Însămânţare pe medii de cultură adecvate fiecărei grupe)
-Însămânţare semicantitativă pe mediu agarizat selectiv MK
-Însămânţare semicantitativă pe medii agarizate selective: ADCL, MC, BSA, CIN-Ye ,TCBS, Wilson- Blair pe mediu diferenţial: MC-sorb
+
-medii de îmbogăţie: bulion selenit acid de sodiu şi AP-alc
-Însămînţare cantitativă pe ADCL, AS (în TIA)
Culturi levuri Însămânţare semicantitativă pe mediu Sabouraud
Însămânţare semicantitativă pe mediu agarizat AS , Schaedler
24 – 72 ore
Colonii caracteristice sunt identificate pe baza testelor primare şi suplimentare (biochimice şi antigenice)
Colonii caracteristice sunt identificate
48 – 96 ore şi peste
Testarea sensibilităţii la antibiotice
Testarea sensibilităţii la antifungice

Etapele examenului microbiologic sunt:
Etapa I în primele 24 ore:
- Examenul microscopic al MF
- Însămânţarea MF pe medii de cultură agarizate şi medii de cultură lichide de îmbogăţire, adecvate categoriei bacteriene, urmată de incubare 15-24 ore;
- Examenul virusologic al MF;

Etapa II după 15-24 ore

- Examinarea culturilor dezvoltate şi repicarea coloniilor suspecte pe bateria minimală de teste biochimice (TSI, mediul cu manită şi un sector de mediu diferenţial AABTL/Drigalski) urmată de incubare 15-24 ore;
- Efectuarea testelor primare -examinarea microscopică a unora din culturile bacteriene (frotiu colorat Gram), testul catalazei ,oxidazei şi coagulazei pentru alte culturi bacteriene;
- Reexaminarea primoculturilor, la 48 ore şi eventuale repicări a coloniilor suspecte dezvoltate tardiv;

Etapa III după 42-72 de ore
- Efectuarea testelor de identificare antigenică (aglutinare pe lamă, latex aglutinări);
- Repicarea coloniilor suspecte pe baterie lărgită de teste biochimice (apă peptonată pentru reacţia indolului, mediu cu lizină şi martor lizină, mediul cu fenilalanină, mediul Simons cu citrat, pe lângă TSI, mediul cu manită şi un sector de mediu diferenţial AABTL/Drigalski, iar pentru alte culturi bacteriene mediul agar cu esculină şi sector de AS) dacă bateria minimală nu a fost concludentă, şi se purifică culturile mixte;
- Efectuarea antibiogramei sau antifungigramei urmată de incubare 24 ore;
- Reexaminarea primoculturilor bacteriene la 72 ore şi eventuale repicări a coloniilor suspecte dezvoltate tardiv;
- Comunicarea rezultatelor examinării microbiologice a MF, prin întocmirea şi tipărirea buletinul de analiză, cod FGL – 5.8-01.

Etapa IV după 72-96 ore şi uneori mai mult
- Comunicarea antibiogramei sau antifungigramei;
- Stocarea culturilor bacteriene patogene şi înalt patogene în eprubete cu agar de stocaj urmată de incubarea lor 24 ore şi parafinarea eprubetelor.

5.0 PROCEDURA DE LUCRU

Examenul microscopic precede executare culturilor bacteriene.

5.1 EXAMENUL MICROSCOPIC:

- Include examinarea de preparate umede şi/sau fixate, având ca scop vizualizarea citologiei respectiv prezenţa sau absenţa recţiei inflamatorii cu sau fără prezenţa hematiilor cât şi a elementelor parazitare (trofozoiţi, chişti, ouă şi larve), a dominanţei fungilor şi prezenţa în exces a unor produşi de digestie (amidon, fibre musculare , mucus etc.)
- Permite identificarea produsului patologic prin depistarea resturilor alimentare nedigerate, si a elementelor de origine intestinala.
- Permite orientarea diagnosticului spre alte posibile etiologii ale BDA, decat cea bacteriana sau existenta unei etiologii mixte.

Elementele componente pe care le putem gasi:
- resturi alimentare nedigerate sau partial digerate`
- elemente de origine intestinala
- elemente de origine parazitara
- bacterii si levuri

A. Resturi alimentare:
- Fibre musculare striate apar ca urmare a ingerarii carnii

cele digerate au aspectul unor fragmente ovale mai mari sau mai mici, cu capete rotunjite si fara striatiuni, de culoare galbena sau galben aurie din cauza bilei; cand sunt

mai palide –transparente, poate denota o retentie de bila

cele partial digerate sau nedigerate au o culoare galben- inchisa si sunt de obicei mai lungi, au capetele drepte si striatii intacte, pastrandu-se atat desenul longitudinal cat si cel transversal; aparitia lor in numar mare, senifica o insuficienta pancreatica asociata sau nu hiposecretie de acid clorhidric sau un tranzit intestinal accelerat

- Grasimile se pot prezenta cel mai frecvent sub forma grasimilor neutre, care in cantitate mica se pot intalni si in mod normal; se prezinta sub forma de picaturi clare, usor galbui din cauza bilei , cu diametrul variabil.Prezenta unei cantitati mari de grasimi neutre, atrage atentia asupra unui proces de maldigestie de obicei printr-o insuficienta pancreato-biliara.
- Amidonul cu solutia Lugol, se coloreaza in albastru-violet inchis daca este nedigerat si in nuante mai deschise sau chiar in rosu , daca este digerat.

Amidonul inclus este cel organizat din interiorul celulelor (cartofi/leguminoase),se coloreaza in albastru si este inconjurat de o membrana.

Amidonul amorf este cel care a pierdut forma sa organizata si se prezinta sub forma de pete sau trasee albastrui.

Amidonul crud se intalneste mai rar si se prezinta ca gramajoare organizate in straturi concentrice, colorate aproape in negru.

Eritrodextrina, rezultata din digestia amidonului, se coloreaza in rosu. In cazul unor preparate bogate in amidon, in coloratia cu solutia Lugol, acestea iau in intregime culoarea inchisa, vizibila cu ochiul liber. Prezenta sa in cantitate mare, este consecinta unui tranzit intestinal mai accelerat.

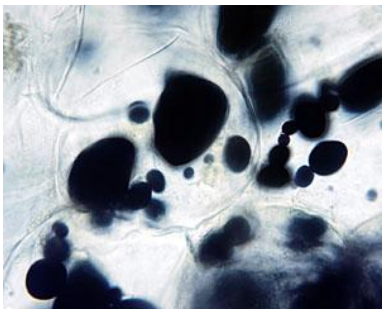
- Celuloza nedigestibila rezultata din alimentele vegetale, se prezinta sub forma de vase vegetale, peri vegetali, spori, graunte de polen, membrane in placarde mai mari sau mai mici, etc. Nu are o semnificatie semiologica.
- Cristale de origine alimentara, in special cristalele de oxalat de calciu intra sau extracelular, in cantitate mare pledeaza pentru o insuficienta gastrica.

B. Elemente de origine intestinala:

- Mucusul se prezinta sub forma unor flocoane transparente ce contin adesea globule rosii, globule albe, celule epiteliale, microbi.In afectiunile inflamatorii se intalneste o cantitate mai mare de mucus.
- Celule epiteliale cilindrice libere sau inclavate in mucus, denota un proces inflamator al peretelui intestinal, atunci cand sunt abundente; uneori se pot intalni si celule pavimentoase detasate odata cu eliminarea scaunului prin canalul anorectal.
- Hematiile intacte denota o hemoragie inferioara (rectala) sau una superioara dar cu un tranzit foarte accelerat; hematiile din hemoragiile digestive superioare nu pot fi recunoscute, fiind distruse.
- Leucocitele, izolate si in numar mic nu sunt semnificative; un numar mare de leucocite trebuie mentionat semnificand un proces inflamator sau ulcerativ care intereseaza segmentul terminal al tubului digestiv; ele abunda in procesele rectale neoplazice sau bacilare, in rectocolita ulcerohemoragica si in diferite boli infectioase cu localizare intestinala, in unelecazuri de dizenterie amibiana sau rectite parazitare, domina eozinofilele.
- Cristale de origine endogena: cristale Charcot-Leyden, au diferite marimi, incolore, se gasesc mai frecvent in diferite parazitoze intestinale. Cristale de hematoidina, de culoare rosie-galbuie sau bruna, romboidale, prismatice, etc. apar dupa diferite hemoragii digestive sau dupa o alimentatie bogata in alimente cu sange.

Cristal de hematoidina

Cristale Charcot-Leyden

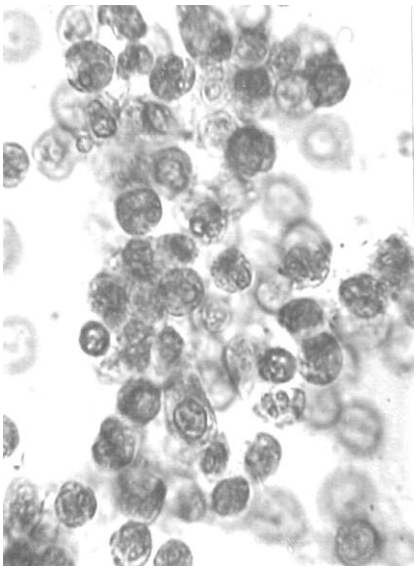


Amidon nedigerat

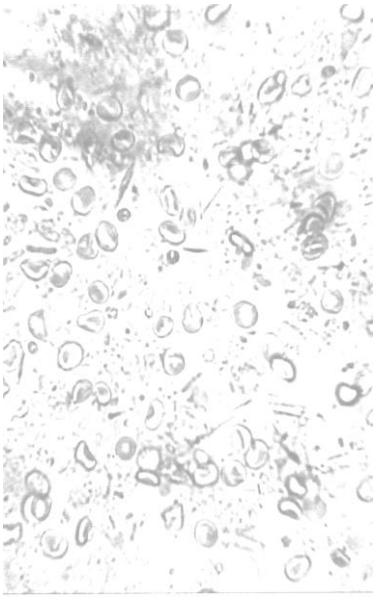
Cristal de acid uric

Lambou cilindric de mucus

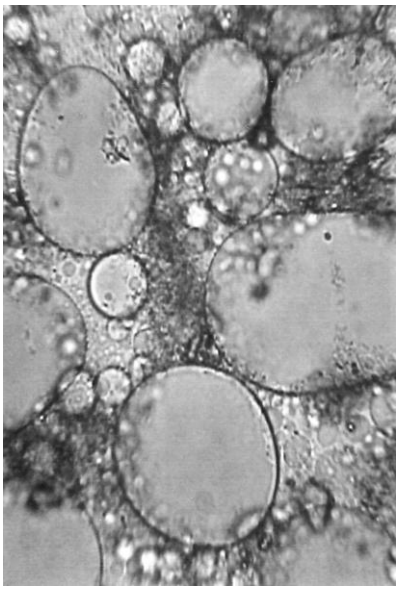
Par vegetal



Reactie inflamatorie – Leucocite



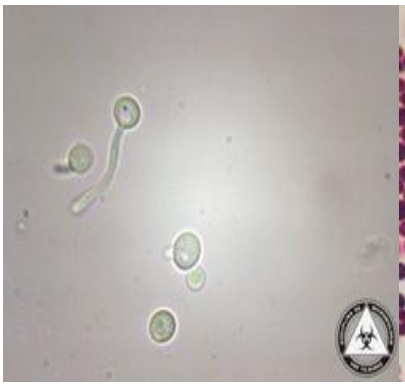
Hematii intacte

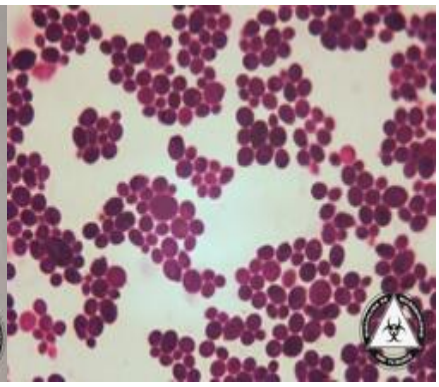


Bule de mucus

C. Elemente de origine parazitara si metodologia lor de identificare , a fost descrisa in PSL-M2-01

D.:Bacterii si levuri: pe preparate necolorate se observa abundenta florei microbiene, eventuala mobilitate a lor, asociata sau nu cu leucocite si hematii ca si prezenta si abundenta unor elemente micologice (levuri, pseudomicelii).


Blastospori cu filamente


Blastospori Gram pozitivi

Granule de polen

5.2 –COPROCULTURA

Coprocultura urmăreşte izolarea şi identificarea bacteriilor patogene şi înalt patogene pe baza caracteristicilor: morfologice , de cultivabilitate, exoenzimatice şi antigenice , implicate în BDA şi TIA

- Însămânţarea se face din proba ca atare recoltată în coprocultor cu mediu de transport Cary Blair, vizând porţiunile lichide şi îndeosebi cele mucoase şi/sau sangvinolente; volumul recoltei trebuie să fie minimum 3-5 mg;
- Mediile de cultură utilizate pentru izolare şi identificare bacteriană, cât şi condiţiile de incubare sunt specifice ficărei categorii bacteriene;
- Inocularea mediilor de cultură se realizează cu ansa, din MF omogenizate în mediul de transport, iar dispersarea inoculului se realizează în 3 grupe de striuri parţial suprapuse, fără flambarea ansei între grupele de striuri; din mediile de îmbogăţire, după o agitare prealabilă a eprubetelor, se procedează la fel; pentru Campylobacter spp., materia fecala se omogenizeaza in prealabil cu Apa peptonata (~5 ml Apa peptonata in eprubeta de 10/100 mm, in care se omogenizeaza materie fecala) si se mentine la temperatura camerei 15-20 minute, in pozitie vericala; dupa sedimentare, se preleva cu o ansa cu bucla mare, din mijlocul coloanei de lichid, si de insamanteaza cu dispersie pe mediul Karmali.
- Repicarea coloniilor suspecte se realizează cu firul de însămânţare, care va fi încălzit la roşu, la începutul şi sfârşitul fiecărei repicări;
- Specia bacteriană urmărită (uzual *Shigella, Salmonella*) este indicată de medicul specialist pe formularul de solicitare analize F-PGL-5.4-1 I Materii fecale; în afara solicitării medicale se urmăresc şi alte specii bacteriene , dacă examenul citologic evidenţiază prezenţa mai ales în număr mare a leucocitelor ± hematiilor (EPEC la nou-născut şi copilul mic, EHEC O:157 H:7, *Campylobacter* spp patogene), iar dacă proba de materii fecale este lichidă ca apa de orez se urmăresc în sezonul cald şi *Vbrio cholerae* / *parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila* / *sobria* , *Plesiomonas shigelloides* etc. efectuându-se însămânţări pe medii de cultură adecvate;

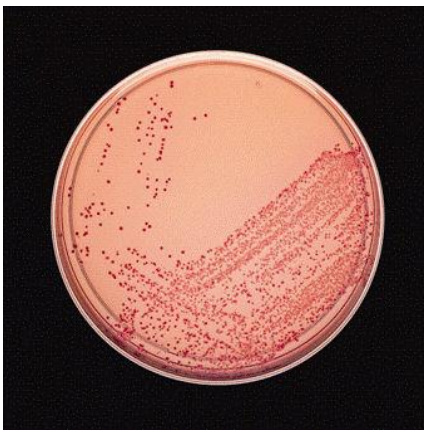
5.2.1 Caracteristici morfologice si de cultivabilitate

Pentru speciile Salmonella, Shigella, Escherichia coli si Yersinia enterocolitica, produsul patologic se insamanteaza pe mediile ADCL, MC-sorb, CIN-Ye si Bulion selenit acid de sodiu. Dupa incubare aeroba la 37°C timp de 16-24 de ore, se examineaza culturile dezvoltate.
Se observă de cele mai multe ori o varietate de colonii , morfologic deosebite, aparţinând unor specii bacteriene diferite. In cazul in care nu se obtin colonii izolate, pentru a obţine culturi pure, se repică si se dispersează pe sectoare de mediu ADCL, pentru a obţine subculturi pure.Dacă

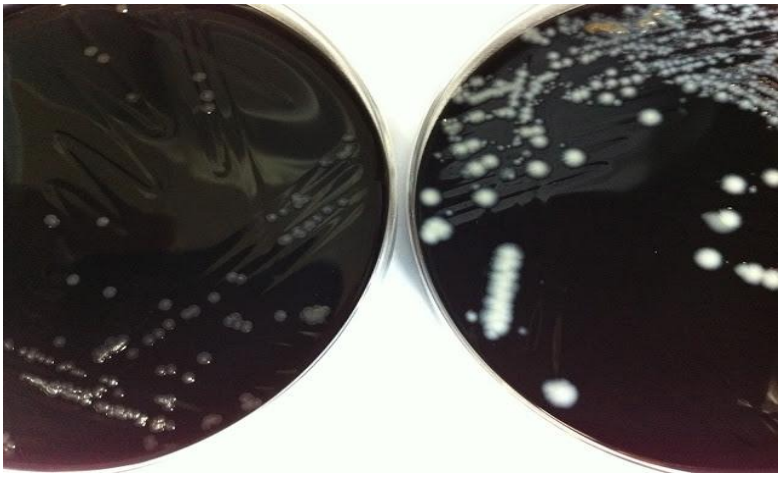
sunt colonii izolate suspecte, se pot însămânţa mediile de cultură pentru identificarea caracterelor biochimice.

Escherichia coli *Salmonella* *Shigella*

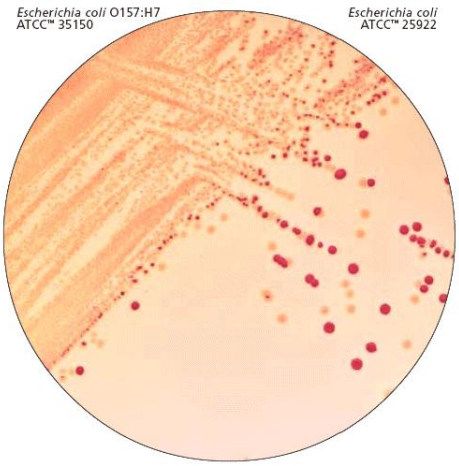
Mediu ADCL



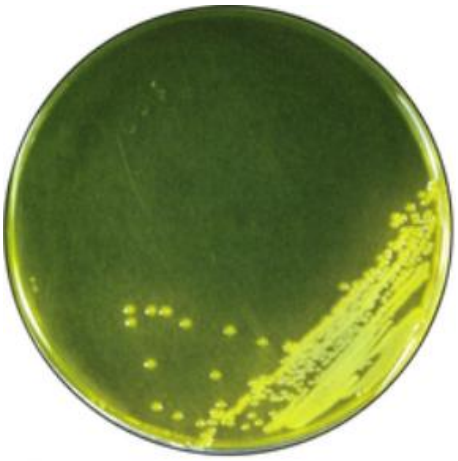
Yersinia enterocolitica (pe mediul CYNYe)



Mediu Karmalli:
Campylobacter spp. in stanga
Coliform in dreapta



Mediu Mc-sorb
EHEC –colonii translucide

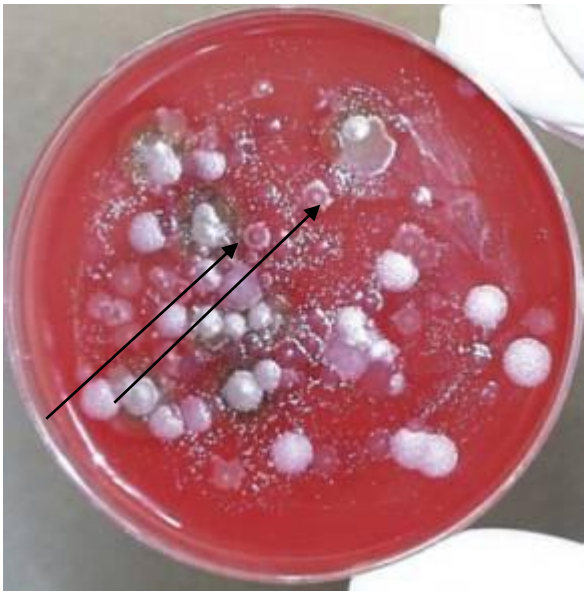


Vibrio cholerae - TCBS agar

Vibrio parahaemolyticus- TCBS agar

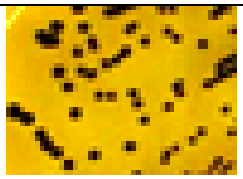
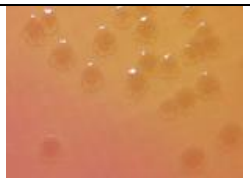
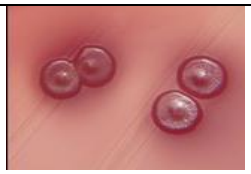
Bacillus cereus - AS

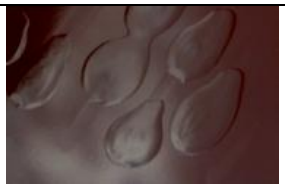
Bacillus cereus - AS

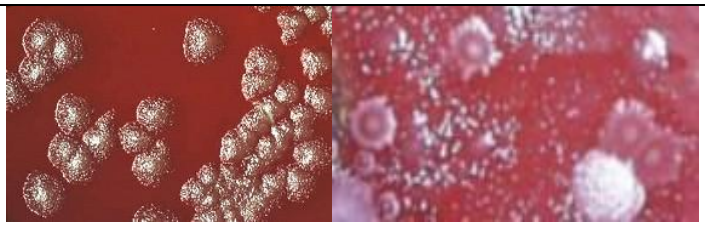


Bacillus antracis- AS

Aspectul coloniilor:

Specia	Aspectul coloniei pe mediul ADCL
Salmonella spp.	 Colonii de 1,5-2 mm, translucide cu central negru, lactoză negative, raportul dintre centrul negru şi periferia translucidă, este în favoarea părţii translucide
Salmonella typhi	 Colonii de 1-2 mm lactoză negative, cu un mic centru negru, care la unele colonii este foarte mic, sau apare mai târziu
Shigella spp.	 Colonii de 2,5-2,5 mm translucide, bombate sau mai aplatizate, lactoză negative
Yersinia enterocolitica	 Colonii 1-1,5 mm translucide, convexe, lactoză negative, care uneori se dezvoltă după 3-5 zile de incubare la temperatura camerei
Escherichia coli	 Colonii roşii sau roz intens, mai mult sau mai puţin opace de 2-3 mm, lactoză pozitive, mai puţin bombate
Proteus spp.	 Colonii mari de 2-3 mm, lactoză pozitive, bombate , cu centrul negru, raportul centrul negru şi partea roşie, este în favoarea centrului, cu miros de ouă clocite, datorită hidrogenului sulfurat.

Klebsiella spp.	 Colonii mari 2-4 mm cu tendinţă de confluare, bombate, convexe, culoare roz intens, în general lactoză pozitive
Yersinia enterocolitica	 Pe mediul CINYe, coloniile sunt de 1-2 mm, translucide cu centrul roşu
Campylobacter jejuni	 Colonii cenusiu-inchis cu tenta maronie si tendinta de a se intinde pe striul de insamantare- mediul Karmali
Vibrio parahaemolyticus	 Aspectul coloniilor pe mediul TCBS
Aeromonas hydrophila	 Aspectul coloniilor pe mediul TCBS
Vibrio cholerae	 Aspectul coloniilor pe mediul TCBS
Bacillus cereus	Colonii hemolitice, cu margini neregulate, La prelevarea coloniei cu ansa, aceasta se desprinde aidoma albusului de ou nebatut

Bacillus antracis	 Coloniile sunt non-hemolitice, plate sau uşor convexe, cu margini neregulate si aspectul sticlă mată. Există de multe ori proiecţii de la marginea coloniei care dau aspectul de " cap de meduza- " La prelevarea coloniei cu ansa, aceasta se desprinde aidoma albusului de ou batut

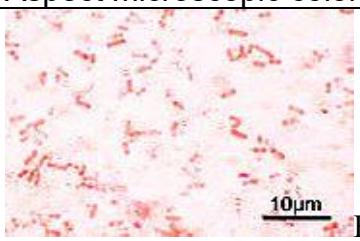
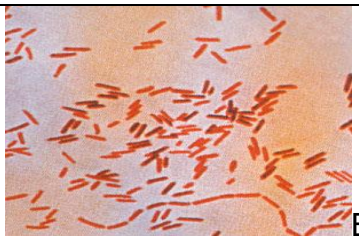
Incubarea pentru Campylobacter spp, se realizeaza la 40-42°C, in jar cu plic Campygen (care creiaza atmosfera de incubare propice cu azot), iar durata incubarii se prelungeste 48-72 de ore. Pentru Yersinia enterocolitica, incubarea la 37°C, a mediului ADCL, se prelungeste 2-3 zile la temperatura camerei- coloniile suspecte dezvoltate in aceste conditii se identifica pe baza caracteristicilor biochimice si antigenice.

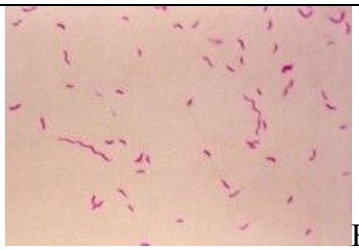
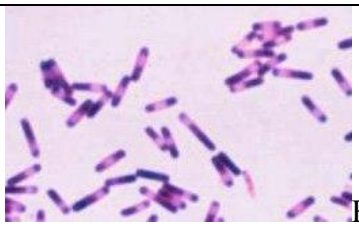
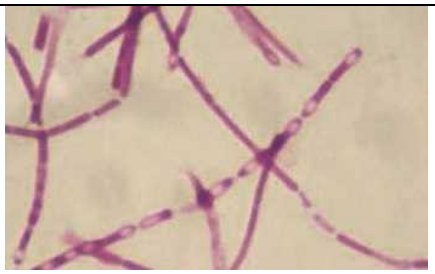
Pentru Vibrio, Aeromonade patogene si Plesiomonas shigelloides, insamantarea initiala se face pe mediul de imbogatire Apa peptonata alcalina si dupa incubare aeroba, se insamanteaza pe mediul BSA si TCBS; examinarea coloniilor dupa 24 h de incubare aeroba, cu efectuarea testelor primare (testul catalazei si testul oxidazei), orienteza diagnosticul.

Pentru Clostridium, insamantarea se face pe mediu special, incubarea in conditii de anaerobioza, in jar.

5.2.2 Examinarea microscopica a culturilor, este necesara pentru unele specii bacteriene: Campylobacter spp. si Vibrio / Aeromonade.

Caracteristici microscopice comparative

Specia bacteriana	Aspect microscopic coloratie Gram
Shigella spp.	 BGN
Salmonella spp.	 BGN

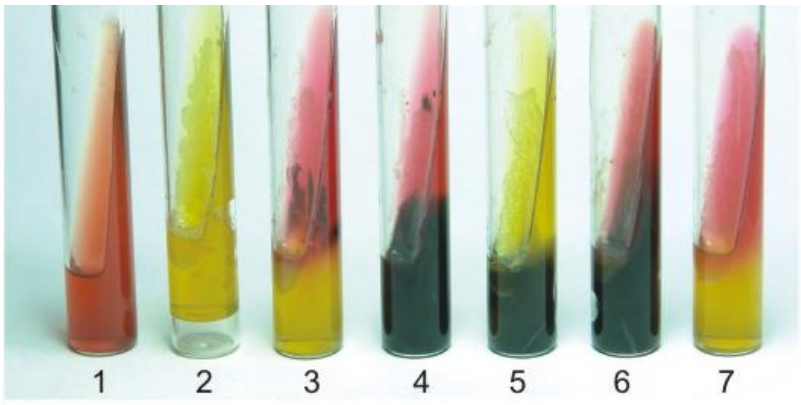
Campylobacter spp.	 BGN spiralati
Clostridium difficile	 BGP sporulati
Clostridium botulinum	BGP sporulati
Vibrio cholerae	
Bacillus cereus	BGP
Bacillus antracis	 BGP sporulati

5.2.3 Identificarea caracterelor exoenzimatice

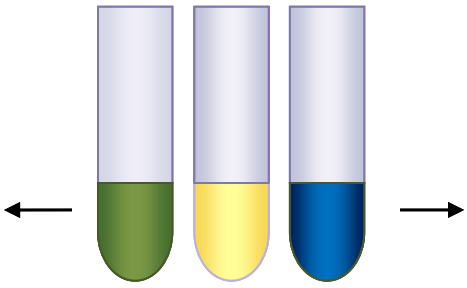
Colonii suspecte se repică pe medii de identificare a caracterelor biochimice. În general se execută 2-3 repicări din colonii diferite, dar asemănătoare morfologic. Repicarea se execută uzual pe mediul TSI si mediul agar cu manită şi uree, (pe care se urmăreşte mobilitatea, fermentarea manitei şi producerea de urează) şi un sector de mediu AABTL(mediu diferenţial pe care bacteriile lactoză pozitive produc virajul mediului în galben , iar cele lactoză negative, lasă mediul

nemodificat.

Mediul TSI



Neînsămânţat *E. coli* *Salmonella typhi* *Proteus spp.* *Citrobacter freundi* *Salmonella typhimurium* *Shigella flexneri*

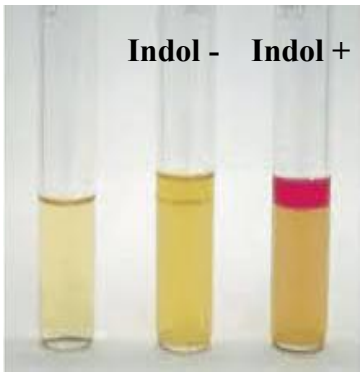


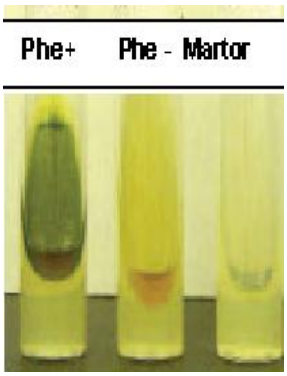
Neînsămânţat Urează pozitiv

Fermentarea manitei

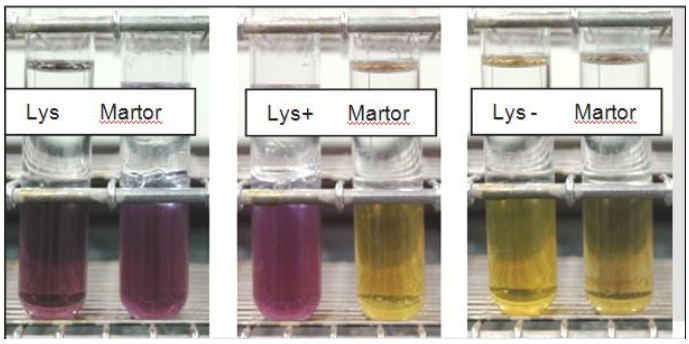
Mediu cu manita

Pentru cazurile neconcludente, se largeste bateria de teste pentru a obtine noi criterii de identificare.





Reacţia indolului Utilizarea citratului ca unică sursă de carbon Dezaminarea Phe



Decarboxilarea lizinei

Caracterele exoenzimatice:

Specia	Mobi-litate	Glu-coza	Lac-toza	Zaha-roza	Hidro-gen sulfurat	Gaz din glucoză	Indol	Li-zină	Ci-trat	Phe	Urea za	Manitol	Oxidaz a
Salmonella spp.	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Salmonella typhi	+	-	-	-	+/-	+/-	-	+	-	-	-	-	-
Shigella flexneri	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- exceptie varianta manita negativa	-
Shigella sonnei	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
Shigella dysenteriae	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	-
E. coli	+ excepti e E.coli inactiv	+	+	V	-	+	+	d	-	-	-	-	-
Yersinia enterocoliti ca	- 37° + 25°	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Campylo bacter spp.	+	-	-	-	-/+	-					-	-	+
Vibro spp.	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Aeromonas spp.	+	+	+/-	+/-	-	+/-	+	+/-	-	-	-	+/-	+
Plesiomonas shigelloides	+ (slab)	+	+/-	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-	+ aglutina re + cu ser anti Shigella sonnei

5.2.4 Identificarea caracterelor antigenice

Identificarea caracterelor antigenice se realizează cu seruri pentru aglutinarea pe lamă. Pentru *Salmonella* spp. se utilizează:

- Seruri polivalente care conţin aglutinine pentru:

grupele ABDEL (conţine aglutininele 1,2,12 +4,5,12 +9,12 9,46 + 3,10 +3,15 +1,3,19)

şi separat pentru

grupele CFGH (conţine aglutinine 6,7 +6,8 +11+13,22 +13,23 +6,14,24 +8,20)

- Serururi monovalente de grup:

grup B (O:4,5)
grup D (O:9)
grup C (O:6,7,8)
grup E (O:9,12,26)
grup A (O:1,2)

- Ser monovalent Vi
- Seruri flagelare h

Aglutinarea cu unul din serurile polivalente de grup (aglutinare netă, uşor vizibilă cu ochiul liber, în 60 de secunde)denotă apartenenţa tulpinii la una din grupele majore cuprinse în ser; se continuă cu serurile monovalente de grup, grupele B şi D fiind cele mai frecvente, se începe aglutinarea cu ele (aglutinare netă, uşor vizibilă cu ochiul liber, în 60 de secunde)

Dacă nu aglutinează cu nici unul dintre serurile polivalente, şi caracterele exoenzimatice sunt pentru *Salmonella* spp.,se încearcă aglutinarea cu Ser monovalent Vi dacă aglutinează în 30 de secunde, aglutinare netă, vizibilă cu ochiul liber, se poate afirma că tulpina poate fi *Salmonella typhi* sau paratyphi. Se termoinactivează tulpina, şi se reiau aglutinările cu serurile polivalente, monovalente şi seruri h (h::d, h:c, h:a, h:b)

Cu ajutorul serurilor polivalente si monovalente precum si a serurilor h (antigene H) se pot determina serotipurile genului Salmonella conform clasificarii Kauffman–White

Pentru Shigella spp. , sunt seruri:

Polivalent flexneri
Polivalent sonnei
Anti Boydi C1, C2, C3
Antidysenteriae 1-7
Antidysenteriae 8-12

Pentru Yersinia enterocolitica, sunt serul monovalent O3 şi O9.

Pentru EPEC sunt :

Ser nonavalent
Ser trivalent 1 (Mixtură de 3 Serotipuri O111+O55+O26)
Ser trivalent 2 (Mixtură de 3 Serotipuri O86+O119+O127)
Ser trivalent 3 (Mixtură de 3 Serotipuri O125+O126+O128)
Ser trivalent 4 (Mixtură de 3 Serotipuri O114+O124+O142)

- Bacteriile patogene şi înalt patogene izolate şi identificate pe baza testelor biochimice şi antigenice sunt testate pentru sensibilitatea şi rezistenţa la antibiotice si stocate în eprubete cu mediu agarizat de transport, parafinate şi expediate la Institutul „I. Cantacuzino”-Bucureşti, pentru confirmarea identităţii şi tipare bacteriană.

Pentru EHEC O:157H:7 identificarea antigenica se face prin latex aglutinare, kitul continand, martor pozitiv si martor negativ.

Pentru Campylobacter spp. enteropatogene kitul contine carduri dryspot, precum si martor pozitiv si negativ.

5.2.5 COPROCULTURA ÎN TIA

Avand in vedere plurietiologia TIA, metodologia examenului microscopic se aplica si in aceste cazuri iar insamantarile semicantitative se executa pe toate mediile de cultura, inclusiv pe AS, pentru urmarirea stafilococilor, streptococilor si a speciilor de Bacillus in special Bacillus cereus. In paralel se executa coprocultura cantitativa, prin diluarea materiilor fecale in ser fiziologic, astfel incat sa obtinem o dilutie finala de 10^{-5} si $10^{-7,}$ prin insamantarea a 0,1 ml din dilutia 10^{-3} respectiv10^{-5}, pe mediul ADCL si AS. Scopul acestei metode este de a determina specia bacteriana patogena sau conditionat patogena care se gaseste intr-o cantitate mare, peste limita acceptata, pentru continutul materiilor fecale.

NOTA:

Aceasta metodologie de insamantare cantitativa se aplica si in situatiile in care in care medicul clinician solicita coprocultura pentru bacterii conditionat patogene: *Psudomonas aeruginosa, Klebsiella spp, Serratia marcescens* ((sindromul scutecului rosu)., sau se estimeaza proportia coloniilor dezvoltate si identificate din aceeasi specie bacteriana.

Schema dilutiilor pentru coprocultura cantitativa:

Nr. Epriubeta	**1**	**2**	**3**
Ser fiziologic	9 ml	10 ml +	10 ml +
Materii fecale	~ 1 mg (o ansa cu bucla mare)	0,1 ml	0,1 ml
	omogenizare	omogenizare	omogenizare
Dilutia	10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}
Cantitate folosita pentru insamantare	-	0,1 ml	0,1 ml
Dilutia finala pe placa	-	10^{-5}	10^{-7}

Dupa 24 ore de incubare, se numara coloniile morfologic identice. Calcul: Nr. Colonii X dilutia. Daca numarul coloniilor dezvoltate este mai mare de 1X 10^{-7} pentru bacterii conditionat patogene (din aceeasi specie bacteriana), atunci acestea pot fi considerate implicate in etiologia TIA.

5.2.6 Coprocultura in micoze intestinale

Se executa la indicatia medicului clinician sau in cazurile in care examenul microscopic depisteaza prezenta levurilor in cantitate mare si dominanta lor in comparatie cu flora bacteriana uneori diminuata pana la disparitie. Izolarea levurilor se face prin cultivare pe mediul Sabouraud . Pentru a incrimina etiologia micotica, intr-un sindrom diareic, este necesar a determina numarul de unitati formatoare de colonii/ gram sau ml materii fecale si identificarea levurilor respective.

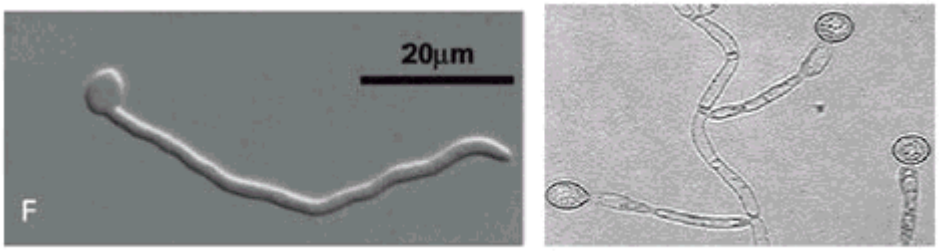
Schema dilutiilor pentru coprocultura cantitativa: pentru levuri

Nr. Eprubeta	**1**	**2**	**3**
Ser fiziologic	9 ml	10 ml +	10 ml +
Materii fecale	~ 1 mg (o ansa cu bucla mare)	1 ml	0,1 ml
	omogenizare	omogenizare	omogenizare
Dilutia	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Cantitate folosita pentru insamantare	-	0,1 ml	0,1 ml
Dilutia finala pe placa	-	10^{-3}	10^{-4}

In paralel cu insamantarea cantitativa din dilutiile 2 si 3 , se insamanteaza si din dilutia initiala, prin dispersie cu ansa, pe mediul Sabouraud. Se incubeaza la 25-37° timp de 2-3 zile. Se numara coloniile dezvoltatesi se face calculul levurilor dupa formula: Nr. UFC X dilutia.Daca numarul coloniilor este mai mare de 10^{-9}, acestea pot fi implicate in diareea candidozica. *Candida albicans* , detine rolul major in etiologia micotica a sindromului diareic la imunodeprimati dupa antibioterapie de lunga durata, etc. Alte levuri se pot intalni in scaunul diareic, dar rolul lor in etiologia BDA este discutabila.

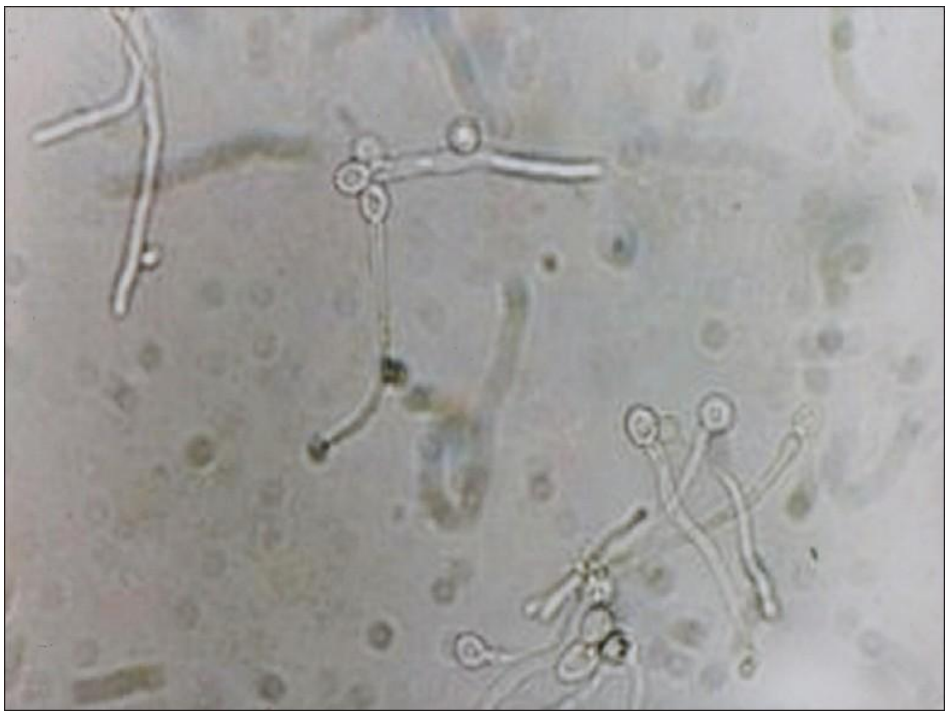
Identificarea pentru *Candida albicans* se bazeaza pe testul de filamentare (testul tubului germinativ)

Candida albicans



Germ Tube (no constriction) Pseudohyphae (constriction)

Diferenta fata de pseudohife



Testul filamentarii

- Se utilizează mediul Sabouraud cu sau fără inhibitori pentru bacteriile aerobe din materiile fecale;

- Însămânţarea MF este identică ca la coprocultura bacteriană, identificarea se realizează prin testul filamentării sau identificare pe galerii API , iar la solicitarea medicului curant se efectueaza antifungigrama.

6.0. CONTROLUL DE CALITATE

Reactivii necesari, mediile de cultură, sunt controlate cu tulpini de referinţă existente la nivelul compartimentului.

Tulpini de referinţă: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610;

Aceste controale sunt introduse în lucru la fiecare lot de medii de cultură achiziţionate sau ori de câte ori este nevoie.

Tulpinile izolate si identificate se expediaza la Institutul „I. Cantacuzino” Bucuresti, pentru confirmarea identitatii bacteriene.

Periodic se executa insamantari paralele, din aceeasi proba biologica si comparari interpersonale (a doua opinie).

7.0 COMUNICAREA REZULTATELOR SI VALORI DE REFERINTA

A.Examen citologic: Valoare de referinta : Absente/rare leucocite

“Rare leucocite (≤ 2-5 leucocite/ camp microscopic-obiectiv 40x)” in holera, viroze, etc.

“Reactie inflamatorie moderata (≥ 20 leucocite/camp microscopic-obiectiv 40x)” in salmoneloze, amoebioza, etc.

„Reactie inflamatorie importanta (≥ 50 leucocite/camp microscopic-obiectiv 40x)”in shigeloze

Dupa caz, se precizeaza prezenta/absenta hematiilor.

B.Examen parazitologic: Valoare de referinta: Absente structuri parazitare

„ Prezent...” – se mentioneaza parazitul identificat

C.Examen micologic: Valoare de referinta: Absente/rare levuri

„ Prezente numeroase levuri/ pseudomicelii”

D. Examen digestie in Lugol: Absenti produsi anormali de digestie

E. Coprocultura: Valoare de referinta: Negativa (se precizeaza specia bacteriana cultivata)

„ Coprocultura pozitiva pentru....” .....(se precizeaza specia bacteriana cultivata si identificata)

F. Coprocultura cantitativa: Valoare de referinta: Negativa la dilutia 10^{-5} si 10^{-7}

„ Nr.colonii x dilutia ”.....(se precizeaza specia bacteriana cultivata si identificata)

7.1 Raportare rezultate:

1. în baza de date a Spitalului
2. medicului curant / pacientului prin Buletinul de analiza
3. Directiei de Sanatate Publica –Iasi, conform metodologiei anuale de supraveghere a teritoriului pentru BDA.

8.0 SURSE DE EROARE

Pot fi cauzate de:

- prelevarea probelor biologice dupa instituirea antibioterapiei
- lipsa mediului de transport care mentine viabilitatea trofozoitilor, larvelor si bacteriilor
- stocarea probelor biologice recoltate in mediu de transport mai mult de 18-24 ore la temperatura camerei ceea ce permite dezvoltarea florei microbiene de asociatie
- etichetare gresita a probei sau inregistrare incorecta in Registrul de comenzi interne/ Registrul de analiza –rezultatul analizei se comunica pentru alt pacient.
- eroare de interpretare a caracterelor biochimice si antigenice al bacteriilor, corectabile prin comparari interpersonale si bilaterale intre intre laboratoare

9. 0 RESPONSABILITĂŢI

MANAGERUL TEHNIC:

- Verifică şi aprobă prin semnătură şi parafează buletinul de analiză, cod FGL- 5.8-01
- Oferă consultanţă beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită
- Execută analizele pentru care este responsabil şi validează rezultatul acestora prin semnătură şi parafă

RESPONSABILUL DE ANALIZĂ

- Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize
- Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deserveşte compartimentul 02, din registrul de lucru
- Examinează preparatele de microscopie optică şi culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, execută repicările, aglutinările pe lamă şi latex aglutinările, interpretează caracterele exoenzimatice dezvoltate de bacterii şi a aglutinărilor pe lamă, respectiv a latexaglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de laborator şi formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru
- Întocmeşte şi tipăreşte buletinul de analiză
- Verifică, semnează şi parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01 şi îl prezintă managerului tehnic spre aprobare

ASISTENTUL DE LABORATOR

- Preia coprocultoarele cu probe biologice concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de receptură.
- Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registrul de lucru.
- Transportă mediile de cultură şi sticlăria pregătite pentru utilizare, în compartimentul de lucru şi pregăteşte mediile de cultură pentru însămânţare.
- Efectuează însămânţarea produselor biologice pe medii de cultură, pregăteşte preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic
- Transmite buletinul de analiză, registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltare

10.0 ÎNREGISTRĂRI ŞI ANEXE

- Registrul de comenzi interne/externe –pentru probele acceptate 4.4. - 01 I E
- Registrul de comenzi respinse- pentru probele necorespunzatoare RGL 4.4- 02
- Registrul de analize RGL – 4.4 – 01 I - MATERII FECALE
- Bulletin de analiza FGL- 5.8 - 01

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICĂ

DETERMINAREA PARAMETRILOR DE BIOCHIMIE PRIN METODE FOTOCOLORIMETRICE, IMUNOTURBIDIMETRICE

Cod PS-B5-01
Editia 1, Revizia 0

Din data de
01.05.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr Rodica Fantanaru

VERIFICAT
Responsabil Calitate
As.Lorena Zaborila

Elaborat:
Sef compartiment biochimie
Chim princ. Valentina Holban

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Biochimie	2.		Chim prin. Valentina Holban					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1. SCOP SI DOMENIU DE APLICARE 5

2. DOCUMENTE DE REFERINTA 5

3.DEFINITII SI ABREVIERI 5

3.1.Definitii 5

3.2. Prescurtari 5

4.DESCRIEREA PROCEDURII 6

4.1. Semnificatie clinica 6

4.2. Principiul metodei.....6

4.3. Resursele necesare……..6

4.4. Produsul biologic de analizat……..6

4.5.Descrierea activitatii……..6

4.6.Activitati finale……7

4.7.Valori de referinta……...7

5.RESPONSABILITATI……8

6.INREGISTARI SI ANEXE……9

1. SCOP ŞI DOMENIU DE APLICARE

Această procedură de testare descrie metoda de determinare a concentraţiei parametrilor de biochimie din lichide biologice (ser, plasmă, urină, LCR, lichid de puncţie etc.) folosind metode de determinare biochimică fotometrice (end-point, cinetic) şi turbidimetrice. Prin această procedură se determină urmatorii analiţi:

1. **Glucoza**
2. **Uree**
3. **Cretinină**
4. **Acid uric**
5. **Proteine totale**
6. **Bilirubina totală**
7. **Bilirubina directă**
8. **Colesterol**
9. **Trigliceride**
10. **DHDL**
11. **DLDL**
12. **Calciu**
13. **Magneziu**
14. **Fier**
15. **ALT**
16. **AST**
17. **Amilază**
18. **GGT**

2. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ

1. SR EN ISO/CEI: 15189:2007 - Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă
2. SR EN ISO/TR 22869 - Laboratoare medicale. Ghid pentru implementarea în laboratoare a ISO 15189 : 2003
3. SR EN ISO 15190 : 2005 - Laboratoare medicale. Cerinţe pentru securitate
4. ORDINUL MS 1226/2012 privind gestionarea deşeurilor rezultate din activităţi medicale.
5. SR ISO/TR 22869/2005 - Laboratoare medicale.Ghid pentru implementarea în laboratoare a ISO 15189:2003.
6. Manualul calităţii laboratorului, cod MCL-01
7. Manualul de operare al analizatorului RX Imola
8. Manualul reactivilor RX Imola „Protocol de lucru"
9. Manualul de service „RX Imola Service Manual"
10. Marcela Zamfirescu-Gheorgiu, Aurora Popescu, Tratat de biochimie medicală, vol.I şi II, Ed. Medicală, Buc. 1991

11. Iulian Mincu, Nicolae Hâncu, Bolile metabolice în practica medicală, Cluj-Napoca, Ed. Dacia, 1981
12. Jacques Wallach, "Interpretarea testelor de diagnostic", editie internaţională, Editura Ştiintelor Medicale
13. Prospect calibrator LEVEL 3 cod CAL 2351
14. Prospect control LEVEL 2 cod HN 1530
15. Prospect control LEVEL 3 cod HE 1532
16. Prospect control Hb A1c cod HA 3445
17. Prospect control Lipid control 1 cod LE 2668
18. Prospect control Lipid control 2 cod LE 2669
19. Prospect control Lipid control 3 cod LE 2670

3. DEFINIŢII SI ABREVIERI.TERMINOLOGIE

3.1. DEFINIŢII

- *Specificitatea analitică*: termen care exprimă calitativ măsura în care alte substanţe interferă cu determinarea unei substanţe potrivit unei proceduri date. Substanţele interferente pot fi endogene sau exogene.

- *Specificitatea clinică* este definită ca probabiltatea ca prin testare să se obţină un rezultat negativ în absenţa analitului specific.

- *Senzitivitatea clinică* este definită ca probabilitatea ca prin testare să se obţină un rezultat pozitiv în prezenţa analitului respectiv.

- *Acurateţea (exactitatea) măsurării*: apropierea (concordanţa) dintre rezultatul unei măsurări şi valoarea reală („true value") a măsurandului.

- *Limita de detecţie (sensibilitate)* : rezultat singular minim care, cu o anumită probabilitate, poate fi distins (diferenţiat) de valoarea blancului. Limita defineşte punctul de la care analiza devine posibilă şi aceasta poate fi diferită de limita inferioară a domeniului analitic determinabil.

- *Calibrare:* ansamblul de operaţii care stabilesc în condiţii specificate relaţia dintre valorile unei mărimi indicate de un aparat de măsura sau un sistem de măsurare

- sau dintre valorile reprezentate de o măsură sau un material de referinţă şi valorile corespunzătoare realizate cu etaloane.

- *Validare:* confirmarea, în baza unei examinări şi pe baza punerii la dispoziţie a unei dovezi că cerinţele particulare pentru o utilizare specială sunt satisfăcute.

- *Trasabilitatea*: o proprietate atribuită unui rezultat test sau valoare măsurată care poate fi raportată la o referinţă fixată, de obicei standarde naţionale sau internaţionale, printr-o serie continuă de ecuaţii (determinări) ale căror incertitudini sunt cunoscute.

- *Incertitudinea de măsurare*:
  - estimaţie, caracterizând intervalul de valori în interiorul căruia se găseşte valoarea adevărată a măsurandului. (VIM, ediţia I, 1984)
  - limitele intervalului de valori, care, cu o anumită probabilitate include valoarea adevărată a măsurandului.

3.2. ABREVIERI

- **IRU** – unitatea de incubare a reacţiei
- **ASP** – unitatea probelor
- **RCU** – unitatea caruselului de reactivi
- **RPT** – unitarea de pipetare a reactivilor
- **SPT** – unitatea de pipetare a probelor
- **RPP** – unitatea de aspirare a reactivilor
- **SPP** – unitatea de aspirare a probelor
- **WPP** – unitatea de aspirare a apei
- **DTP** – unitatea de măsurare optică
- **MIX** – unitatea de agitare (mixerul)
- **WU** – unitatea de spălare
- **POW** – Power Unit
- **CNT** – Control Unit
- **MS** – multistandard

- **QC** – control de calitate
- **ALT (TGP,GPT)** – alanin aminotransferază
- **AST (TGO, GOT)** – aspartat aminotransferază
- **ALP (ALPDEA)** – fostfaza alcalină
- **HDL (DHDL)** – high density lipoproteins
- **LDL (DHDL)** – low density lipoproteins
- **γ-GT(GGT)**-γ Glutamil transferază
- **HbA1c**– hemoglobină glicozilată
- **MGXB** – magneziu (xylidyl blue)
- **RPT** – reagent precision test
- **RX WASH** – soluţie de spălare
- **SALINE** – soluţie salină
- **IRON** – fier
- **CHOL** – colesterol
- **GLUPAP** – glucoză (metoda cu glucozoxidază şi peroxidază)
- **TRIGS** – trigliceride
- **CREA** – creatinină
- **UA** – acid uric
- **UREA** – uree
- **CALC** – calciu
- **AMY** – amilază
- **TP** – proteine totale
- **TBIL** – bilirubina totală
- **DBIL** – bilirubina directa
- **STB** – stabilitate la bord expirată

4. DESCRIEREA PROCEDURII

4.1. SEMNIFICAŢIE CLINICĂ

4.1.1 GLUCOZA

Glucoza este principala sursă de energie a organismului. Insulina produsă de celulele insulelor Languerhans facilitează intrarea glucozei în celulele ţesuturilor. O

deficienţă de insulină sau o diminuare a activităţii sale duce la o creştere a glucozei sanguine.

Valori crescute ale glicemiei (hiperglicemia) se întâlnesc în:

- diabet zaharat
- boli endocrine: acromegalie, boala Cushing, hipertiroidie, obezitate
- stres psihic, frig, sedentarism
- după administrarea unor medicamente: ACTH, diuretice, corticosteroizi (diabet steroidic), acid nalidixic, tetraciclină, tiroxină
- boli ale sistemului nervos central (tumori, encefalite), infarct miocardic, pancreatite

Valori scăzute ale glicemiei (hipoglicemie) se întâlnesc în:

- boli endocrine: hipotiroidism, boala Addison, hipopituitarism, tumoare de pancreas (insulinom)
- supradozare de insulină
- boli de ficat care scad sinteza de glucoză: hepatită cronică, ciroză, tumori, icter prin obstrucţie
- după unele toxine: alcool, insecticide, plumb, tetraclorură de carbon
- inaniţie, eforturi fizice mari, subnutriţie, febră

4.1.2. UREE

Ureea este produsul final al metabolismului proteic, fiind sintetizată în principal în ficat. Eliminarea ei prin urină reprezintă principala cale de eliminare a nitrogenilor, fiind unul din mecanismele principale de detoxifiere a amoniacului.

O concentraţie crescută de uree în plasmă apare într-un regim bogat în proteine, prin catabolism crescut al proteinelor, după o hemoragie gastro-intestinală, deshidratare, stare de şoc, insuficienţă cardiacă sau tratament cu glucocorticoizi (uree prerenală).

Uremia postrenală este cauzată de obstrucţia fluxului urinar, litiaza renală, tumoră sau hipertrofie de prostată. Utilizarea ureei ca indicator al funcţiei renale este limitată de variaţia concentraţiei sale plasmatice, consecinţă a factorilor non-renali.

Deoarece producţia cea mai importantă de uree are loc în ficat, suferinţele hepatice (hepatite cronice active, ciroze hepatice) pot duce la scăderea ureogenezei cu reducerea valorilor ureei în sânge.

4.1.3 ACID URIC

Acidul uric este o substanţă azotată ce reprezintă produsul final al degradării derivaţilor purinici liberi: adenină, hipoxantină, guanină.

Acidul uric sanguin variază în funcţie de alimentaţie, vârstă, sex, zonă geografică şi moştenire genetică.

Când producţia de acid uric depăşeşte concentraţia normală, se poate depune în jurul unor articulaţii producând guta sau se solidifică în căile urinare sub formă de calculi urinari de acid uric sau uraţi.

Perturbarea proceselor de uricogeneză şi / sau a celor de eliminare a acidului uric generează hiperuricemia.

Principalele mecanisme inductoare de hiperuricemie sunt:

1) Hiperuricemia primară:
- sinteză execesivă de metaboliţi
- diminuarea eliminărilor urinare ale acidului uric

2) Hiperuricemia secundară:
- producţia endogenă crescută în special prin hipercatabolism al nucleotidelor tisulare, anemie hemolitică, poliglobulie, sarcoidoză, sindroame mieloproliferative, psoriazis, neoplazii, boli infecţioase caşectizante
- consum excesiv de produse din carne (în special ficat, rinichi, creier)
- diminuarea eliminărilor urinare de acid uric în boli renale cronice (insuficenţă reanală, tuberculoză renală, hidronefroză)
- alcoolism cronic
- după administrarea unor medicamente: diuretice, acid salicilic, testosteron, citostatice
- Valori scăzute ale acidului uric (nu au mare semnificaţie în patologie) apar în:
- subnutriţia proteică
- boli hepatice (prin sinteza scăzută)
- după medicamente care scad sinteza sau elimină acidul uric din sânge (allopurinol, colchicină, fenilbutazonă, uralyt)

4.1.4 CREATININA

Creatinina este produsul final al catabolismului creatinei (sau fosfocreatinei). Cantitatea produsă în fiecare zi este în funcţie de masa musculară. Creatinina este filtrată liber prin glomeruli (mici cantităţi sunt rezorbite şi secretate prin tubii renali).

Determinarea concentraţiei de creatinină este utilizată în principal pentru evaluarea funcţiei renale (perfuzie renală deteriorată, pierderea funcţiei nefronilor) şi controlul dializei renale (creşterile creatininei în sânge sunt expresia deteriorării filtratului glomerular).

Creatinina crescută în sânge exprimă boli acute sau cronice renale, cu afectarea filtrării glomerulare (glomerulonefrită acută, insuficienţă reanală, distrofia musculară progresivă).

Valori crescute ale creatininei pot apărea şi după unele medicamente: salicilaţi, barbiturice, kanamicină, vitamina C.

Valori scăzute ale creatininei se întâlnesc în hipertiroidism.

4.1.5 PROTEINE TOTALE

Proteienele totale serice sunt reprezentate de totalitatea proteinelor existente în ser: albumine, globuline, lipoproteine, enzime etc.; provin din alimente şi din sinteză la nivelul ficatului din glucide şi chiar din grăsimi. Excepţie fac imunoglobulinele care sunt produse de plasmocitele din splină, noduli limfatici, măduvă.

Valori crescute ale proteinelor totale serice apar în:

- hipercatabolism proteic
- alimentaţie excesivă cu proteine
- mielom multiplu, boala lanţurilor grele, macroglobulinemia Waldenström, colagenoze
- creşteri relative prin hemoconcentraţie şi deshidratare (vărsături, diarere, transpiraţii abundente)
- după administrarea unor medicamente care fie cresc sinteza de proteine, fie falsifică reacţia de dozare a heparinelor: corticosteroizi, heparină, clofibrat, insulină, morfină etc.

Valori scăute apar în:

- deficit de aport proteic (inaniţie, subnutriţie, vărsături)
- tulburări de digestie şi absorbţie proteică

- boli hepatice, hepatită, ciroză (duc la scăderea sintezei albuminelor)
- pierderi de proteine în hemoragii, arsuri, boli de rinichi (glomerulonefrită, sindrom nefrotic)
- în hemodiluţie prin consumul exagerat de lichide apare o scădere relativă
- în stări care produc un consum mare de proteine: boli febrile, hiperfuncţia glandei tiroide, efort fizic intens, sarcină, alăptare, stres
- după intoxicaţii cu benzen, tetraclorură de carbon, după unele medicamente: anticoncepţionale orale, salicilaţi

4.1.6 BILIRUBINA TOTALĂ

Bilirubina este produsul de catabolism al hemului hemoglobinei eliberate din eritrocite vechi sau defecte. Bilirubina trece în sânge, apoi în ficat, de unde este eliminată în bilă.

În sânge, bilirubina se găseşte sub două forme:

- bilirubină indirectă sau neconjugată
- bilirubină directă sau conjugată (conjugarea se face cu acid glucuronic la nivelul microzomilor hepatocitelor)

Valorile crescute ale bilirubinemiei indirecte se găsesc în:

- distrugerea unor mari cantităţi de globule roşii: icterul noului nascut prin izoimunizare Rh sau prin perturbări enzimatice, anemie pernicioasă, intoxicaţie saturnină, anemii hemolitice
- boli genetice: sindromul Crigler – Najjar, sindromul Gilbert
- după tratament cu unele medicamente se pot obţine rezultate fals pozitive: anticoncepţionale orale, citostatice, diazepam, eritromicină, fenilbutazonă, indometacin, paracetamol, gentamicină etc.

Valori crescute ale bilirubinei directe se întâlnesc în:

- congenital: sindromul Rotor, sindromul Dubin – Johnson
- boli hepatice: hepatită acută virală, hepatită cronică activă, ciroză, obstrucţia căilor biliare
- intoxicaţii medicamentoase

4.1.7 BILIRUBINA DIRECTĂ

Bilirubina directă se mai numeste bilitubină conjugată deoarece este reprezentată de acea fracţie de bilirubină care la nivel hepatic este conjugată cu acid glucuronic pentru a putea fi apoi excretată prin canalele biliare în intestin.Reprezintă forma de excreţie a bilirubinei totale.

Orice obstrucţie a canalelor biliare este însoţită de creşteri marcate ale bilirubinei directe în sânge.

Măsurarea bilirubinei , compus organic format in timpul distrugerii normale sau anormale a eritrocitelor, este folosită in diagnosticarea şi tratamentul in tulburarile hemolitice, hematologice si metabolice ale ficatului, cum ar fi hepatitele sau blocaj biliar.

4.1.8 COLESTEROL

Colesterolul este o substanţă lipoidă izoprenică (este un sterol de greutate moleculară mare care conţine structura unui ciclopentanofenantren).

Colesterolul este în parte absorbit din alimente, dar el este şi sintetizat de ficat şi de alte ţesuturi.

Colesterolul este transportat în plasmă de lipoproteine; este secretat ca atare în bilă sau după o transformare de acizi biliari.

Creşterea concentraţiei colesterolului în sânge peste limitele normale contribuie la formarea ateromatozei care, în final, este responsabilă de bolile cardiovasculare (infarct miocardic, HTA, accidente vasculare cerebrale).

Colesterolul are următoarele funcţii:

- este element constitutiv al tuturor membranelor celulare
- este precursor al sintezei hormonilor steroizi (corticosuprarenalieni şi sexuali), acizilor biliari şi sărurilor biliare şi al vitaminei D.
- este constituient al lipoproteinelor plasmatice
- Valori crescute ale colesterolului (hipercolesteromia) se întâlnesc în următoarele cazuri:
- după o alimentaţie bogată în colesterol
- boli genetice care favorizează sinteza crescută de colesterol şi din alte substanţe decât grasimile
- insuficineţa tiroidiană (mixedem)

- sindrom nefrotic, ictere colostatice, sarcină, diabet zaharat, obezitate, alcoolism, gută
- după anumite medicamente: corticosteroizi, salicilaţi, fenotiazine, anticoncepţionale orale, vitamina A, vitamina D

Valori scăzute ale colesterolului (hipocolesteromia) se întâlnesc în:

- subnutriţie, eforturi fizice mari, inaniţie
- boli hepatice (hepatite cronice, ciroză) – în care scade sinteza de colesterol
- hiperfuncţia glandei tiroide
- boli febrile (pneumonie, febră tifoidă)
- boli caşectizante (TBC)
- hipocolesterolemie esenţială
- boli de sânge: hemofilie, anemie Biermer
- după unele medicamente: estrogeni, EDTA, tiroidă, tiroxină, heparină, kanamicină

4.1.9 HDL-COLESTEROL DIRECT

Scăderea concentraţiei de HDL-colesterol în plasmă este corelată cu ateroscleroza, baza infarctului miocardic şi a accidentelor cerebrovasculare.

HDL-colesterolul se află în concentraţie scăzută în următoarele afecţiuni:

- boli hepatocelulare acute şi cronice
- malnutriţie severă
- diabet
- anemie cronică
- stres acut, fumat, anumite medicamente

Urmărirea valorilor de HDL-colesterol şi LDL-colestrol este indicată pentru identificarea riscului de boli coronare.

4.1.10 LDL-COLESTEROL DIRECT

LDL - colesterolul este sintetizat in ficat sub actiunea enzimelor lipolitice. În celulele parenchimului hepatic există receptori specifici care facilitează eliminarea LDL –

colesterolului din plasmă. Concentraţia de LDL – colesterol este cel mai important factor in producerea aterosclerozei coronariene.

Determinarea cu maximă acurateţe a LDL – colesterolului este de importanţă vitală în terapia hipolipemiantă pentru a preveni sau reduce progresia aterosclerozei şi a evita ruperea plăcilor ateromatoase.

4.1.11 TRIGLICERIDE

Trigliceridele sunt esteri ai acizilor graşi cu glicerolul care provin din alimentaţie sau sunt sintetizaţi de ficat.

Trigliceridele sunt transportate în plasmă de lipoproteine. Sunt folosite de ţesutul adipos, muşchi, şi alte ţesuturi. Prima lor funcţie este de a furniza energie celulelor.

În organismul uman trigliceridele intră în constituţia lipoproteinelor cu densitate foarte mică: VLDL (59%), chilomicroni (81 – 88%) şi HDL-colestrol (3%).

Valori crescute ale trigliceridelor se întâlnesc în:

- boli hepatice
- diabet zaharat şi obezitate
- alimetaţie bogată în grăsimi, zahăr, după consumul de alcool
- hipotiroidie
- sindrom nefrotic
- obstrucţia căilor biliare
- boli genetice – hiperlipoproteinemia familială tip IV sau V
- sarcină, după utilizarea anticoncepţionalelor orale

Valori scăzute ale trigliceridelor se întâlnesc în:

- neoplasme
- hipertiroidie
- infecţii cronice

4.1.12 CALCIU TOTAL

Din totalul calciului sanguin, circa 45% este legat de proteine, iar restul este liber şi se numeşte calciu ionic.

Calciul este cationul cel mai răspândit din organism, localizat în os (99%), ţesuturile moi şi lichidul extracelular. Concentraţia sa plasmatică este reglată de hormonul paratiroidian, vitamina D şi calcitonină.

Ionul de calciu este important în transmiterea impulsului nervos, în menţinerea contractilităţii normale a muşchilor, ca şi cofactor în anumite reacţii enzimatice, în coagularea sângelui, în formarea substanţei osoase alături de fosfor.

Hipercalcemia poate fi dată de:

- intoxicaţia cu vitamina D
- insuficienţă renală accentuată
- tumori ale glandelor paratiroide (hiperparatiroidism)
- imobilizare prelungită la pat
- tumori ale oaselor şi ficatului, mielom, boala Paget
- alte boli: sarcoidoză, tireotoxicoză, carcinoame metastatice osoase, TBC, feocrocromocitom

Hipocalcemia se întâlneşte în:

- hipoparatiroidism primar sau secundar
- pseudohipoparatiroidism (pierderea sensibilităţii ţesuturilor la parathormon)
- carenţe minerale: osteomalacie, rahitism
- insuficienţă reanlă cronică şi nefroză
- deficienţă de vitamina D, malnutriţie sau malabsorbţie intestinală
- tulburări electrolitice: hipokaliemie
- alte boli: ciroză hepatică, pancreatită acută, tetanie, spasmofilie
- postmedicamentos: corticosteroizi, gentamicină, heparină

Variaţiile calcemiei ionice le urmează pe cele ale calcemiei totale.

4.1.13 MAGNEZIU

Magneziul este unul dintre cei mai abundenţi cationi din organism. Este stocat în principal în os, dar şi secreţiile biliare şi gastrice conţin cantităţi semnificative de magneziu.

Magneziul este un cofactor esenţial pentru enzimele implicate în respiraţia celulară, în glicoliză şi în trasportul transmembranar al altor cationi. Are rol în buna funcţionare a sistemului nervos central şi în contracţia musculară.

Rinichii sunt principalele organe implicate în homeostazia magneziului.

Valori crescute ale magneziului (hipermagneziemie) se întâlnesc în:

- insuficienţă renală cronică decompensată
- diabet zaharat
- stări de deshidratare
- boala Addison
- boli hepatice: ciroză, icter prin obstrucţie
- după medicamente pe bază de magneziu: sulfat de magneziu, antiacide (dicarbocalm, ulcerotrat, trisilicalm).

Valori scăute ale magneziului (hipomagneziemie) se întâlnesc în:

- aport insuficient alimentar sau prin tulburări de absorbţie alimentară
- pierderi de magneziu pe cale intestinală (vărsături, diaree) sau urinară (după diuretice)
- alcoolism (eliminarea crescută de magneziu)
- hipoparatiroidism, mixedem
- tetanie normocalcemică
- după unele medicamente: insulină, edurin, calciu

4.1.15 FIER

Fierul este prezent în diferite compartimente ale organismului: hemoglobina, mioglobina, ţesuturi (în principal în ficat, splină, măduvă osoasă). Doar 0,1% din totalul fierului din organism este prezent în plasmă. Concentraţia sa variază din numeroase cauze fiziologice sau patologice.

Importanţa fierului constă în sinteza hemoglobinei şi a unor enzime celulare.

Valori crescute ale fierului se întâlnesc în:

- hemocromatoză, ciroză, hepatită acută, nefrită, intoxicaţie cu plumb
- transfuzii repetate de sânge, distrugeri de eritrocite (anemie hemolitică)

- după unele medicamente: anticoncepţionale orale, preparate din fier, ampicilină, penicilină

Valori scăzute ale fierului se întâlnesc în:

- aport alimentar scăzut sau absorbţie scăzută
- la femei în cursul sarcinii, naşterii, alăptăţii
- infecţii acute şi cronice
- pierderi de sânge: hemoragii acute sau cronice
- alte boli: lupus eritematos, sindrom nefrotic, ciroză hepatică

4.1.16 HEMOGLOBINA GLICOZILATĂ

Determinarile de hemoglobină glicozilată sunt folosite pentru monitorizarea pe termen lung a diabetului.

4.1.17 ALT

ALT este prezentă în diferite ţesuturi, dar în cea mai mare concentraţie este în ficat şi rinichi. În ser, concentraţia de ALT este crescută în hepatite şi alte forme de boli hepatice asociate cu necroza: mononucleoză infecţioasă, colestoză, ciroză, tumori hepatice, delirum tremens şi după administrarea de diferite medicamente cum sunt opiaceele, salicilaţii, ampicilina. Concentraţia de ALT în ser poate fi crescută şi în boli ale muşchilor cardiac şi scheletici.

4.1.18 AST

AST se găseşte în cea mai concentraţie în ficat şi în muşchiul cardiac, dar este în cantitate mare şi în muşchii scheletici, rinichi şi pancreas. Concentraţia de AST în ser este crescută în hepatite şi alte forme de boli hepatice asociate cu necroză: mononucleoză infecţioasă, colestoză, ciroză, tumori hepatice, delirum tremens şi după administrarea de diferite medicamente. Concentraţia de AST în ser este de asemenea crescută după infarct de miocard, în caz de boli ale muşchilor scheletici (cu distrofie musculară progresivă), pancreatite acute, boli de sânge.

4.1.19 FOSFATAZA ALCALINĂ

Fosfataza alcalină din ser provine din os, ficat şi intestinul subţire. Fosfataza alcalină are valori crescute în ser în următoarele afecţiuni:

- afecţiuni hepatice: hepatită virală acută, colestoză extrahepatică (litiază, tumori), tumori hepatice, granulomatoze hepatice,
- afecţiuni osoase: cancer osos, metastaze osoase, boala Paget, rahitism, osteomalacie, fracturi, osteomielită,
- hiperfuncţia glandei paratiroide,
- insuficienţă renală cronică,
- boli ale intestinului.

4.1.20 AMILAZA

Amilaza este eterogenă şi prezentă în ser sub forma a două izoenzime : salivară şi pancreatică.Variaţii patologice cu importanţă diagnostică se întâlnesc în pancreatita acuta si cronica , cancer de pancreas, parotidite, litiaza biliara, creşteri nespecifice în peritonite şi sarcină extrauterină perforată.Valorile crescute în ser sunt însotite de creşteri ale activităţii amilazei urinare.

4.1.21 GGT

GGT este sintetizată de membranele şi citoplasma celulelor epiteliilor căilor biliare, prostatei, celulelor tubulare renale şi ale căilor excretorii pancreatice. Are valori crescute în ser în cazul afecţiunilor hepatice, colestoze, tumori hepatice, pancreatite.

DESCRIEREA METODELOR DE ANALIZĂ FOLOSITE (principiul metodei)

4.2.1 Determinarea glucozei în lichide biologice (ser, urină, C.S.F.) o realizăm prin 2 metode:

a) Metoda GOD/PAP – reacţie colorimetrică

Prin metoda GOD/PAP glucoza este măsurată după oxidarea ei enzimatică în prezenţa glucozoxidazei, cu formare de peroxid. Peroxidul format reacţionează cu 4-aminofenazonă şi fenol sub acţiunea peroxidazei, rezultă un compus colorat în roşu

violet, quinoneimina, a cărei culoare este direct proporţională cu concentraţia glucozei (măsurată la 505nm).

Linearitatea reacţiei este asigurată până la o concentraţie a glucozei de 630 mg/dl, iar în cazul rerun-ului cu diluţie, până la 6300mg/dl.

Precizia metodei: concentraţia minimă de glucoză măsurată prin această metodă este de 9.55 mg/dl.

b) Metoda cu hexokinază – reacţie cinetică

Măsurăm glucoza în lichide biologice, prin metoda enzimatică cu hexokinază, utilizând 2 enzime: hexokinaza şi glucozo-6-P-dehidrogenaza, iar măsurarea are loc în UV (304nm)

$$\text{Glucoza} + \text{ATP} \xrightarrow{HEXOKINAZA} \text{G-6-P} + \text{ADP}$$

$$\text{Glucozo-6-P} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{G-6-P-DH} \text{gluconat-6-P} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Modificarea absorbanţei datorată creşterii concentraţiei de NADH în detrimentul NAD, este direct proporţională cu concentraţia de glucoză măsurată.

4.2.2 Ureea

Ureea o determinăm prin metoda cinetică enzimatică cu urează, în UV. Ureea este hidrolizată în prezenţa apei de către urează la amoniu şi CO_2 . Amoniul produs se combină cu α-cetoglutaratul şi NAHD-ul în prezenţa glutamatdehidrogenazei, cu formarea de glutamat şi NAD. Modificarea absorbanţei datorită formării de NAD în locul NAHD-ului consumat este proporţională cu concentraţia de uree din lichidul biologic (ser sau plasma). Pentru dozări de uree în urină se diluează urina (colectată fără aditivi, timp de 24 ore) 1:20, cu ser fiziologic şi se multiplica rezultatul cu 21.

$$\text{Uree} + \text{apa} \xrightarrow{ureaza} 2\ NH4^+ + CO_3^{2-}$$

$$NH4^+ + \text{2-oxoglutarat} + \text{NADH} \xrightarrow{GLDH} \text{L- glutamat} + \text{NAD}^+ + \text{apa}$$

Linearitatea racţiei este de până la 204mg/dl şi de 760mg/dl în cazurile de rerun cu diluţie.

Minimul de detecţie în această metodă este de 1.46mmol/l.

4.2.3 Acid uric

Metoda utilizată de noi pentru măsurarea acidului uric în ser sau plasma este enzimatică / colorimetrică. Acidul uric este convertit de către uricază la alantoină şi peroxid. Aceasta, sub influenţa catalitică a peroxidazei, formează cu 4-aminofenazonă un compus colorat în roşu violet, quinoneimina, a cărei culoare este direct proporţională cu concentraţia de acid uric măsurată.

$$\text{acid uric} + 2\ H_2O + O_2 \xrightarrow{uricaza} H_2O_2 + \text{alantoina} + CO_2$$
$$H_2O_2 + 4\ AAP + TOOS \xrightarrow{peroxidaza} \text{quinonimina} + 2\ H_2O$$

Linearitatea reacţiei este asigurată până la o concentraţie de 23.1 mg/dl, iar în caz de rerun (cu diluţie) până la 38.5mg/dl.

Concentraţia minimă detectabilă este < 36 μmol/l.

4.2.4 Creatinina

Creatinina o determinăm prin metoda colorimetrică, după următorul principiu: creatinina cu acidul picric în mediu alcalin cu formarea unui compus colorat a cărui rată de formare este măsurată şi este direct proporţională cu concentraţia de creatinină din lichidul biologic de analizat (ser, plasmă, urina). Pentru măsurătorile de creatinină din urină se procedează la o diluţie de 1+9 cu apă distilată şi se ia în calcul factorul de diluţie.

Linearitarea este asigurată până la o concentraţie de 22mg/dl în ser şi de 900 mg/dl în urină. În caz de rerun linearitatea este până la 60.5 mg/dl în ser şi de 24.75 g/l în urină.

Concentraţia minimă detectabilă prin această metodă este de 27 μmol/l.

Clearence de creatinină se calculează după formula: (mg creat./dl urina x ml urina 24h)/(mg creat./dl ser x 1440)ml/min.

4.2.5 Proteinele totale

Proteinele totale le dozăm prin metoda colorimetrică cu reactivul biuret. Proteinele formează în mediu alcalin cu ionii de cupru un compus colorat al cărui intensitate de culoare este direct proporţională cu concentraţia de proteine măsurată în ser sau plasmă.

Linearitatea reacţiei este până la 112g/l proteine, iar în caz de rerun până la 244 g/l.Concentraţia minimă detectabilă prin această metodă este de <6.42g/l.

4.2.6 Bilirubina totală o dozăm prin metoda colorimetrică Jendrassik Grog (1938). În prezenţa cafeinei bilirubina totală este eliberată de pe molecula de albumină şi reacţionează cu acidul sulfanilic diazotat cu formarea unui compus colorat a cărui intensitate de culoare este direct proporţională cu bilirubina totală.Evităm măsurarea pe probe hemolizate deoarece interferă cu analiza.

Linearitatea reacţiei este până la 25mg/dl, în caz de rerun până la 117mg/dl.

Concentraţia minimă detectabilă este de 1.5 μmol/l.

4.2.7 Bilirubina directă

Determinarea bilirubinei conjugate(directe) se bazează pe capacitatea bilirubinei directe de a reacţiona direct cu acidul sulfanilic şi reactivul diazo (fără accelerator).Se formează un compus colorat în roşu, intensitatea culorii fiind direct proporţională cu concentraţia bilirubinei directe în ser.

4.2.8 Colesterolul se determină prin metoda enzimatică endpoint. Esterii de colesterol sunt hidrolizaţi sub acţiunea colesterolesterazei şi se formează colesterolul şi acizi graşi. Colesteroloxidaza acţionează asupra colesterolului format şi rezultă colestonă şi peroxid. Produsul final de reacţie este quinonimina, formată sub acţiunea preoxidazei asupra peroxidului de hidrogen, în prezenţa aminoantipirinei şi a fenolului. Intensitatea culorii quinoneiminei formate este direct proporţională cu concentraţia colesterolului din probă.

Reacţia este *liniară* până la o concentraţie de 643 mg/dl, iar concentraţia minimă detectabilă este de 0.43 mmol/l.

4.2.9 HDL – colesterolul îl determinăm prin metoda directă, fără pretratarea probei, metodă ce ne asigură o mai mare acurateţe a rezultatelor.

Determinarea constă în 2 reacţii distincte:

1. Eliminarea din particulele lipoproteice a chilomicronilor, VLDL-c, LDL-c sub acţiunea colesterolesterazei, colesteroloxidazei şi a catalazei (care acţionează asupra peroxidului de hirdrogen fomat în urma acţiunii primelor 2 enzime) cu formare de H_2O şi O_2.
2. Măsurarea specifică a HDL-c, după eliberarea lui din particulele lipoproteice sub acţiunea unui detergent din reactivul R2; primele 2 reacţii enzimatice sunt identice cu cele din prima etapă, dar asupra peroxidului de hidrogen acţionează peroxidaza cu formare de compus colorat care apoi este măsurat, fiind direct proporţional cu

concetraţia HDL din proba; în reacţia a doua acţiunea catalazei este inhibată de către azida de sodiu din reactivul R2.

Reacţia este *lineară* până la 144mg/dl, în caz de rerun până la 216 mg/dl.

Concentraţia minimă detectabilă de HDL prin această metodă este de 1.43 mg/dl.

4.2.10 LDL – colesterolul îl dozăm printr-o metodă directă similară celei prin care se măsoara HDL-colesterolul. Reacţia se desfăşoară în 2 etape succesive:

A. Eliminarea chilomicronilor, VLDL, HDL prin acţiunea colesterolesterazei, a colesteroloxidazei şi catalazei.
B. Măsurarea specifică LDL-colesterolului după eliberarea lui din particulele lipoproteice sub acţiunea unui detergent din reactivul R2.

În etapa a doua a reacţiei acţiunea catalazei este inhibată de către azida de sodiu din reactivul R2.

Reacţia este *lineară* până la o concentraţie de LDL-colesterol de 860mg/dl, iar în caz de rerun până la 8600mg/dl.

Concentraţia minimă detectabilă prin această metodă este de 7.35 mg/dl.

4.2.11 Trigliceridele le dozăm prin metoda colorimetrică GPO-PAP, după o hidroliză enzimatică a trigliceridelor cu lipază. Produsul final de reacţie, măsurabil şi proporţional cu concentraţia de trigliceride din probă este quinoneimina rezultată în urma acţiunii peroxidazei asupra H_2O_2 format în primele reacţii de hidroliză, în prezenţa 4-aminofenazonei.

Prin hidroliza trigliceridelor se formează glicerol liber, dar glicerolul liber aflat în probă va fi la fel metabolizat şi, în consecinţă, va creşte fals rezultatul pentru concentraţia trigliceridelor. De aceea, se aplică o corecţie a rezultatului prin scăderea a 10mg/dl din rezultatul obţinut pentru trigliceride.

Reacţia este *lineară* până la concentraţia trigliceridelor de 1133 mg/dl, iar concentraţia minimă detectabilă este de 11.5 mg/dl.

4.2.12 Calciu total îl dozăm prin metoda colorimetrică cu orto-crezolftaleină. Ionii de calciu din ser formează în mediu alcalin cu orto-crezolftaleina un complex colorat a cărui intensitate a culorii este direct proporţională cu concentraţia calciului din probă.

Reacţia este *liniară* până la o concentraţie de 20.04mg/dl, în caz de rerun până la 46.76 mg/dl. Concentraţia minimă detectabilă prina ceastă metodă este 0.19mmol/l.

4.2.14 Magneziul îl dozăm prin metoda colorimetrică cu xylidylblue în ser, plasmă şi urină. Ionii de magneziu reacţionează cu xylidylblue în mediu alcalin rezultând un compus colorat în roşu măsurat la 510 nm, direct proporţional cu concentraţia ionilor de magneziu.

Interferenţa calciului este exclusă prin complexarea sa cu EGTA din reactiv.

Magneziul se măsoara în ser, plasmă sau urină. Urina colectată din 24 ore poate conţine în sediment săruri de magneziu. Înaintea măsurării de magneziu în urină se adaugă o picătură de HCl (pH3-4) pentru a dizolva sedimentul urinar si a elibera magneziul, apoi se face o diluţie de 1 + 4 cu apă distilată; rezultatul se înmulţeste cu 5.

Nota : fluctuaţiile în valorile blankului > 10 % se pot datora contaminării cu magneziu a echipamentului.

Metoda este lineară până la o concentraţie de 5, 59 mg/dl, iar în caz de diluţie şi rerun, până la 14, 0 mg/dl.

Concentraţia minimă de magneziu detectabilă cu această metodă este de <0.29mmol/l.

4.2.15 Fierul il dozăm printr-o metodă colorimetrică cu Ferrozine. Ionul feric din ser este disociat de pe proteina transportoare, transferina, în mediu acid şi, simultan, redus la ionul feros. Acesta reacţionează cu ferozina din reactivul cromogenic şi formează un compus colorat, care are maximum de absorbanţă la 546 nm şi a cărei intensitate de culoare este direct proporţională cu concentraţia de fier măsurată.

Evităm dozarea fierului pe seruri hemolizate şi pe probele de plasmă (concentraţii mici de EDTA pot da rezultate fals scăzute).

Reacţia este lineară până la concentraţia de 198 µmol/l, în caz de rerun până la 398 µmol/l.

Concentraţia minimă detectabilă de Fe cu această metodă este < 2.0µmol/l.

4.2.16 Hemoglobina glicozilată o determinăm ca % din Hb totală, în sânge integral printr-o metodă imunologică, utilizând anticorpi monoclonali de şoarece anti HbA1c . Măsurăm atât concentraţia Hb totale, cât şi a HbA1c , apoi calculăm % HbA1c din Hb totală.

În prima etapă are loc pretratarea probei de sânge total cu reactivul denaturant care lizează eritrocitele eliberând Hb prin acţiunea unei enzime.

În următoarea etapă măsurăm Hb totală cu Reactivul TOTAL Hb; aceasta implică conversia tuturor derivatelor de Hb în *hematină* în soluţie alcalină, care este măsurată la 600 nm.

Măsurarea HbA1c se bazează pe o reacţie de aglutinare cu latex. Reactivul aglutinator , care constă într-un polimer sintetic ce conţine multiple copii ale porţiunii imunoreactive a HbA1c , produce aglutinarea particulelor de latex legate cu anticorpi monoclonali anti HbA1c.

În absenţa HbA1c în probă, aglutinatorul din R2 aglutinează particulele de anticorpi anti HbA1c din R1, aglutinare care produce o creştere a absorbanţei.

În prezenţa HbA1c în probă, rata de aglutinare scade pentru că HbA1c competiţionează cu aglutinatorul pentru locurile de legare a anticorpilor de pe latex. De aceea, creşterea absorbanţei este invers proporţională cu concentraţia HbA1c în probă.

Creşterea absorbanţei datorată aglutinării o măsurăm la 700 nm, iar concentraţia de HbA1c o calculăm pe o curbă de calibrare.

Pretratarea probei de sânge total : într-o eprubetă pipetăm 400 µl reactiv de denaturare cu 10 µl sânge integral, agităm evitând formarea spumei, incubăm minim 5 minute la temperatura camerei înainte de determinare.

Calculul : %HbA1c = [HbA1c (g/dl)/THb (g/dl)] x 10

Interferenţe : Pacienţii cu valori mici de Hb (anemii severe) sau cu valori foarte mari nu sunt monitorizaţi prin această metodă.De asemenea, forme patologice de Hb (varianta S, C sau F) pot să dea valori eronate de HbA1c.

Linearitatea reacţiei este de până la 23 g/dl Hb totală, iar intervalul de determinare pentru HbA1c este de 0, 25 – 2, 4 g/dl.

Concentraţia minimă de HbA1c detectabilă este de 0, 25 g/dl

4.2.17 ALT(GPT /alaninaminotransferaza) o dozăm în UV, metodă standardizată după IFCC.

ALT catalizează transferul grupării amino de pe un aminoacid (alanină) pe alt aminoacid (alfa – oxoglutarat) în prezenta NADH, după coenzimă. Scăderea absorbanţei la 340 nm, datorată consumului de NADH şi formării NAD este invers proporţională cu activitatea enzimei.

$$\text{L- Alanine + 2- oxoglutarat} \xrightarrow{ALT} \text{piruvat + L – glutamate}$$

$$\text{Piruvat + NADH +H}^{+} \xrightarrow{LDH} \text{L- Lactat + NAD}^{+}$$

Metoda este *lineară* până la 600 U/l, în caz de rerun, până la 2400 U/l. Activitatea minimă detectabilă a ALT este 10 U/l.

4.2.18 AST (GOT/aspartataminotransferază).

Metoda utilizată (în UV) este optimizată după recomandarea IFCC.

AST catalizează transferul grupării amino de pe acid aspartic pe α-oxoglutarat, în prezenţa coenzimei NADH. Consumul NADH determină o scădere a absorbanţei la 340 nm, invers proporţional cu activitatea AST.

$$\text{L- Alanine + 2- oxoglutarat} \xrightarrow{AST} \text{piruvat + L – glutamate}$$

$$\text{Piruvat + NADH + H}^+ \xrightarrow{MDH} \text{L- Lactat + NAD}^+$$

Linearitatea reacţiei este de până la 600 U/l, în caz de rerun , de 2400 U/l, iar activitatea minimă detectabilă a AST prin această metodă este de 12 U/l.

4.2.19 ALP (Fosfataza alcalina) o determinăm prin metoda cu dietanol amina optimizată la recomandarea IFCC. ALP din proba de analizat hidrolizează p – nitrofenilfosfatul (ca substrat) din reactiv, cu formare de *p –nitrofenol*, de culoare galbenă (măsurat la 405 nm). Intensitatea culorii este direct proporţională cu activitatea ALP.

Linearitatea reacţiei este de până la 800 U/l, în caz de rerun până la 3200 U/l. Activitatea minimă detectabilă este de 25 U/l.

4.2.20 Amilaza o determinăm prin metoda colorimetrică în care substratul enzimei este p-nitrofenilmaltoheptazida. Substratul din reactiv este clivat de către enzima din proba de analizat, cu formare de produşi de clivare mici, cuplaţi cu pNP (paranitrofenilfosfat). Asupra acestor compuşi acţionează α-glucozidază cu formare de glucoză şi pNP. pNP (de culoare galbenă) este măsurat la 405 nm, rata de formare şi deci creşterea absorbanţei este direct proporţională cu creşterea activităţii enzimei din proba de analizat.

α - Glucozidaza

$$\text{Ethyliden-G}_7\text{-PNP} \longrightarrow \text{etiliden –G}_{3,4,5} + \text{G}_{2,3,4} - \text{PNP}$$

$$\text{G}_{2,3,4} - \text{PNP} \xrightarrow{\alpha-GLUCOZIDAZA} \text{p-nitrofenoxid + glucoza}$$

Reacţia este *lineară* până la 1200 U/l, în caz de rerun, 4200 U/l.

4.2.21 GGT îl determinăm printr-o metodă optimizată după Comitetul European pentru Laborator Clinic Standard (ECCLS).

Substratul enzimei este 2 - □□- glutamyl – 3 – carboxi – 4 – nitroanilidă care în prezenţa glycilglycinei este convertit de către enzima □GT din proba, cu formare de p – nitroanilina, care este un compus colorat în galben. Cresterea D.O. pe minut, dată de acest compus colorat este direct proporţională cu activitatea □GT din probă.

Reacţia este *lineară* până la 1280 U/l, în caz de rerun 3200 U/l.

Activitatea minimă detectabilă a □GT prin aceasta metoda este de 8 U/l.

4.3 RESURSE NECESARE

4.3.1 Echipamente şi accesorii

4.3.1.1 Echipamente

Analizor automat de biochimie Rx Imola

Analizor RX Imola seria 7201-0505 produs de "RANDOX LABORATORIES LTD." şi "FURUNO ELECTRIC CO. LTD."

- Analizor
- sistem de purificare apă AQALINE
- sistem cu solutii de spălare 1, 2,
- PC
- Printer

4.3.1.2.Accesorii

- pipete 100 – 1000 µl
- conuri pentru pipete
- tuburi 12x70mm, 12x100mm
- centrifuga Multifuge 3s Heraeus
- frigider, congelator(-20grade)

4.3.2 Reactivi şi alte substanţe

- Apă distilată
- RX WASH CONCENTRATE NR.1 – cod.RX3963
- RX WASH CONCENTRATE NR.2 – cod.RX3962

- C1 WASH Solution – cod. RX3973
- ACID WASH SOLUTION – cod.WS3853
- SALINE – cod. SA3854
- SAMPLE PRECISION TEST SOLUTION – cod. SP3856
- REAGENT PRECISION TEST SOLUTION – cod. RP3857
- Creatinină – cod. CR3814,
- Calciu – cod. CA3808,
- Bilirubină totală – cod. BR3859,
- Bilirubina directa – cod. BR3807,
- Fier – cod. SI3821,
- Glucoză (GODPAP) – cod. GL3815,
- Magneziu – cod. MG3819 , MG3880,
- Uree – cod. UR3825,
- Fosfatază alcalină – cod. AP3803,
- Amilază – cod. AY3805,
- Trigliceride – cod. TR3823,
- DHDL – cod. CH3811,
- DLDL – cod. CH3841,
- GGT – cod. GT3817,
- Colesterol – cod. CH3810,
- Acid uric – cod. UA3824,
- AST – cod. AS3804,
- ALT – cod. AL3801,
- Proteine totale – cod. TP4001,
- HbA1c – cod. HA3830.

4.3.3 Calibratori şi controale

Ca materiale de control şi calibratori se utilizează seruri de origine umană certificate, cu nivel normal şi patologic.

Calibratorii şi controalele se prezintă sub formă de pulbere liofilizată sau lichid gata de lucru. Reconstituirea se face conform instrucţiunilor din kitul fiecăruia.

Stabilitatea calibratorilor si controalelor reconstituite este precizată în prospectele acestora.

Materialele care se prezintă sub formă de pulbere liofilizată, după reconstituire se păstrează la congelator. Termenul de valabilitate pentru materialele care nu au fost deschise este cel înscris pe eticheta fiecărui kit sau flacon.

Conform cu instrucţiunile producătorului şi procedurile specifice de lucru pentru fiecare analiză, la începutul lucrului se efectuează controalele interne pentru toate analizele precum şi calibrările necesare.

Calibrările se fac conform frecvenţei recomandate de producator, ori de câte ori există suspiciuni cu privire la exactitatea unor rezultate şi la schimbarea lotului de reactiv.

Materialele de calibrare şi control utilizate sunt incluse in Lista materialelor de referinţă – Biochimie.

LISTA MATERIALELOR DE REFERINŢĂ - BIOCHIMIE

Nume, cod material	Domeniu de utilizare	Producător	Forma de prezentare	Stabilitate după reconstituire
Direct HDL/LDL colesterol Calibrator, cod.CH2673	Calibrare HDL/LDL colesterol calibrator	Randox	Liofilizat	-5zile la 2-8º -1 lună la -20º
Multicalibrator cod.CAL2351	Multicalibrator biochimie	Randox	Liofilizat	-5zile la 2-8º -1 lună la -20º
Calibrator HB+HbA1c, cod.HA3444	Calibrare hemoglobina glicozilata	Randox	Gata de folosire	-
Lipid control Level2, cod.LE2669	Control lipide-nivel normal	Randox	Liofilizat	-5zile la 2-8º -1 lună la -20º
Human Assayed Multisera-Level2, cod. HN1530	Control multiparametri biochimie-nivel normal	Randox	Liofilizat	-5zile la 2-8º -1 lună la -20º
Human Assayed Multisera-	Control multiparametri	Randox	Liofilizat	-5zile la 2-8º -1 lună la -20º

Nume, cod material	Domeniu de utilizare	Producător	Forma de prezentare	Stabilitate după reconstituire
Level3, cod. HE1532	biochimie-nivel patologic			
Control hemoglobina glicozilata, cod. HA3445	Control hemoglobina glicozilata	Randox	Liofilizat	-5zile la 2-8º -1 lună la -20º

4.4 PRODUS BIOLOGIC DE ANALIZAT

4.4.1. PRODUSE BIOLOGICE DE ANALIZAT

Probele biologice sunt inregistrate la punctul de primire al probelor in sistemul informatic, cind se genereaza un cod unic de identificare, ID, cu care se identifică probele.

Produsele biologice de analizat sunt reprezentate de ser obţinut din eprubeta de biochimie, după centrifugare timp de 5min la 3500 rpm, plasmă şi sânge integral obţinute din eprubeta de hematologie, urina din urorecoltor si lichid de puncție, corespunzatoare din punct de vedere calitativ si cantitativ.

4.4.2. Verificarea si procesarea probelor

Modul de recoltare, identificare, procesare, transport, păstrare şi eliminare a probelor în laborator este descris în Manualul de recoltare al probelor biologice, cod MRP 01, procedurile generale PG 5.4 - Proceduri preanalitice, PG 5.7 – Proceduri postanalitice.

Asistentul de laborator recepţionează proba biologică primară, verifică ID-urile de pe eprubetă şi din Cererea de analiza.

După centrifugare, probele sunt verificate pentru a determina dacă sunt corespunzătoare pentru testare. Probele necorespunzătoare sau cele ale căror caracteristici

pot influenţa calitatea rezultatelor (ex. ser lipemic, hemolizat, icteric, cantitate insuficienta) sunt identificate şi înregistrate în Registrul de probe respinse, cod RGL -4.4-02.

Calitatea rezultatelor poate fi afectată în cazul în care proba este lipemică, hemolizată, icterică sau prezintă precipitate. De asemenea pot aparea interferenţe datorate tratamentelor administrate anterior recoltarii şi din acest motiv se consemneaza acest lucru pe Cererea de analize de catre medicul curant.

Criteriile pentru respingerea probei biologice, sunt :

- identificarea necorespunzătoare a probei
- volum de sânge necorespunzător
- folosirea unui tub de recoltare greşit
- transport şi stocare necorespunzătoare a probei
- hemoliza probei care se poate datora unei puncţii venoase dificile sau manevrării necorespunzătoare a probei
- probele hiperlipemice recoltate posprandial sau la mai puţin de 4 ore de la ultima ingestie de alimente.

Dacă proba nu corespunde cantitativ sau calitativ se informează telefonic clinica de provenienta.

Responsabilul de analiza receptioneaza proba biologica secundara.

4.4.3. Pregatirea si conservarea probelor

După 30 min, timp în care are loc coagularea completă şi separararea serului de cheag, probele biologice se centrifughează la 3500 rotaţii pe minut, timp de 5 minute.

Analiza se face din serul obţinut prin centrifugarea probei primare.

Probele etichetate ca „urgente” se introduc în lucru în maxim o ora de la primire.

Dacă testele nu sunt efectuate în 24 ore, serul se păstrează în criotub etichetat corect, la 2-8°C, timp de 7 zile sau la -20°C pentru mai mult de 7 zile. După dezgheţare proba din criotub este omogenizată cu grijă prin răsturnarea de câteva ori şi nu prin agitare, fără a forma spumă, verificând dacă nu rămâne material nedizolvat.

După analizare se păstrează eşantioane de ser încă 24 de ore, în condiţii care să asigure stabilitatea analiţilor asfel încât să se poată confirma rezultatele, să se poată

verifica identitatea probelor, să se poată efectua investigaţii suplimentare justificate medical, ştiinţific sau medico-legal.

Sângele total pentru HbA1c din vacutainerul de hematologie nu necesită o pregătire prealabilă.

Testarea probelor trebuie efectuată în intervalul de timp și în condițiile specificate în prospectul fiecarei metode.

4.5 MOD DE LUCRU (Procedură de lucru)

4.5.1 Operaţii pregătitoare

Pregătirea analizorului

Se porneşte analizorul de la butonul ON / OFF de pe laterala stângă a aparatului, apoi se porneşte PC – ul (mai întâi monitorul şi apoi unitatea centrală).Daca analizorul a fost lăsat in modul SLEEP pornirea este automată la ora prestabilită.Dupa incalzirea lămpii de halogen (20 min.) analizorul este gata pentru lucru.Se verifică volumul soluţiilor de spălare în rezervoare şi volumul apei distilate (umplerea acestora dacă este necesară).Verificam inventarul de reactivi disponibili la bordul analizorului, necesităţile de recalibrare a testelor, preparăm, decongelăm, eşantionăm după caz materialele de control intern.

Modul de operare este descris detaliat in manualele de operare şi schematic în instructiunile de lucru aferente, Instrucţiuni de operare – RxImola – cod IL-PS-B05-01-01

4.5.2 Întreţinerea echipamentelor

Operaţiunile de întreţinere ale analizoarelor Rx Imola sunt de două tipuri, cele care pot fi făcute de utilizator şi cele care necesită intervenţia unui inginer de service. Meniul aparatului ghidează utilizatorul în efectuarea operaţiunii de întreţinere respective şi monitorizează timpul scurs între 2 operaţiuni, atenţionând utilizatorul cu privire la data viitoarei intervenţii. Mai multe detalii privind întreţinerea echipamentelor de testare (analizoare) precum şi pentru echipamentele auxiliare (centrifugi, distilator) sunt prezentate în dosarele fiecărui aparat în fişele şi anexele corespunzătoare. Modul de completare a acestor înregistrări este descris în procedura generală PG-5.3– Echipament de laborator.

4.5.3 Atenţionări

Măsuri de protecţie a personalului

Toate produsele biologice şi kit-urile de reactivi din laborator sunt tratate ca şi cum ar fi potenţial infectate.

Toate eşantioanele de sânge sau de produse biologice sunt puse în containere sigure care previn scurgerea şi contaminarea feţei exterioare a containerelor.

Toate persoanele care manipulează probe de sânge sau produse biologice (chiar şi scoaterea dopului de la o eprubetă) poartă mănuşi pentru a evita posibilitatea contactului cu lichidul biologic. Mănuşile şi mâinile se spală după terminarea lucrării respective.

Suprafeţele de lucru din laborator sunt dezinfectate cu substanţe chimice adecvate după terminarea lucrului.

Materialele contaminate folosite în laborator sunt decontaminate înainte de a fi puse în saci sau containere în conformitate cu politica laboratorului referitoare la inactivarea materialului folosit.

Toate persoanele îşi spălă mâinile după terminarea activităţii în laborator şi îşi scot echipamentul de protecţie (halat, papuci) înainte de părăsirea laboratorului.

Toate produsele biologice şi kit-urile de reactivi din laborator sunt tratate ca şi cum ar fi potenţial infectate şi personalul respectă următoarelor reguli de bioprotecţie:

1. **Suntem întotdeauna atenţi la** intrare controlată, atenţionarea riscului, majoritatea bacteriilor manipulate în acest laborator sunt patogene pentru om

2. **Purtăm** echipamentul **de protecţie în spaţiile de lucru** : halat, mănuşi, pe toată durata lucrului; la ieşire se schimba echipamentul de protecţie.

3. Nu punem nimic în gură : - nu mâncăm, nu bem, nu fumăm, nu ne machiem în laborator

4. Nu punem obiecte personale pe masa de lucru : ochelari, mănuşi, poşete, batiste; nu utilizăm lentile de contact în spaţiile considerate de risc.

5. Decontaminăm suprafeţele de lucru : cu soluţii dezinfectante avizate şi detergenţi, obligatoriu la încheierea lucrului

6**. Evităm producerea de aerosoli**

7. Ne spălăm pe mâini : cu apă şi săpun ori de câte ori este nevoie şi la sfârşitul programului de lucru

8. În caz de rănire accidentală: anuţăm imediat şeful direct pentru acordarea de îngijiri calificate şi măsuri de urgenţă

9**. Nu lucrăm cu leziuni cutanat neprotejate:** folosim comprese şi bandaje sterile impermeabile

4.5.4 Pregătirea reactivilor

Pregatirea reactivilor

Majoritatea reactivilor pentru determinarile de biochimie sunt gata de utilizare. În cazul celor care necesită preparare această operaţiune o executăm conform prospectelor de lucru furnizate de producător.Utilizăm reactivi dedicaţi pentru analizoarele din dotare. Înainte de începerea lucrului verificăm numărul de teste rămase disponibile în fiecare flacon din caruselul de reactivi prin vizualizarea inventarului de reactivi din softul analizoarelor.

Reactivii utilizati sunt înregistraţi în Registrul consum reactivi.

4.5.5 CONTROLUL DE CALITATE

Pentru determinările parametrilor de biochimie prin metode fotocolorimetrice, imunoturbidimetrice efectuăm controlul intern şi extern de calitate conform PG 5.6. Asigurarea calitatii rezultatelor.

4.5.5.1 Controlul intern de calitate

Controlul intern se face la inceputul lucrului pentru toate analizele. Aceste seruri de control au fost enuntate la capitolul 4.3.3 în Lista materialelor de referinţă.

După efectuarea controlului (cu frecvenţă o data la 8 ore), în fereastra QC din meniul analizorului sunt vizualizate rezultatele efectuării analizelor de analiti asupra serurilor de control în raport cu valorile ţintă şi intervalul de valori permise (± 2SD). Toate aceste date sunt prezentate în format numeric precum şi pe o diagramă Levey-Jennings.

Astfel valorile serurilor de control pot fi interpretate şi pot fi întreprinse acţiunile corective ce rezultă din aceste valori. Rezultatele serurilor de control se arhivează în memoria aparatului şi se tipăresc periodic apoi se indosariază.

4.5.5.2 Controlul extern de calitate

Laboratorul participă la comparări interlaboratoare, în principal la programe de evaluare externă a calităţii internationale. Rezultatele testării unor probe oarbe sunt trimise organizatorilor acestor programe care le interpretează statistic şi le prezintă atât sub formă numerică, cât şi sub formă grafică.

Sunt prezentate valorile următoarelor mărimilor statistice: media rezultatelor măsurărilor efectuate pe aceeaşi probă, deviaţia standard a acestor rezultate şi coeficientul lor de variaţie.

Rezultatele laboratorului sunt comparate cu cele ale unor grupuri de comparaţie (grupul laboratoarelor cu aceeaşi metodă de determinare, grupul tuturor laboratoarelor participante etc.)

Rezultatele comparărilor interlaboratoare sunt analizate de către seful de compartiment impreuna cu RA şi în cazul identificării unor neconformităţi, se iniţiază PG 4.9 – Identificarea şi controlul neconformităţilor.

4.5.6 PROCESAREA REZULTATELOR

Calculul rezultatelor se face automat de către analizor utilizând formule matematice complexe de interpolare a curbelor de calibrare. Aceste proceduri sunt descrise pe larg în manualul aparatului.

4.5.7 RAPORTARE

Executăm raportarea rezultatelor conform PG 5.8. Raportarea rezultatelor analizelor, pe Buletine de analiza medicale generate automat din sistemul infomatic cod FGL-5.8-01. Rezultatele critice sunt înregistrate registru valori de alertă cod. RGL-5.8-01. Valorile considerate critice se regasesc in anexa 2 la procedura.

5. RESPONSABILITĂŢI

5.1 MANAGERUL TEHNIC

- Stabileşte împreună cu şeful de compartiment programul de control extern interlaboratoare.
- Verifică Buletinul de analiză.
- Asigură consultanţă privind rezultatele analizelor atunci când solicitantul o cere.

Notă : Pentru cazul în care este absent, este substituit de locţiitorul său.

5.2 SEFUL DE COMPARTIMENT

- Stabileşte programul de control intern şi extern.
- Verifică şi validează rezultatele controlului intern de calitate.
- Execută analizele pentru care este responsabil şi validează prin semnatură rezultatele.
- Verifică şi validează rezultatele obţinute de către personalul din subordine.
- Validează prin semnătură buletinul de analiză.
- Completează Fişa de capabilitate cod. F-PG02-05.

5.3 RESPONSABILUL DE ANALIZĂ

- Execută analizele pentru care este responsabil şi validează prin semnatură rezultatele acestora
- Verifică şi validează rezultatele controlului intern de calitate.
- Validează şi introduce în softul de management pacienţi rezultatele analizelor.
- Întocmeşte Buletinul de analiză şi confirmă autenticitatea rezultatelor, prin semnătură.

5.4 ASISTENTA DE LABORATOR

- Recepţionează produsele biologice de analizat
- verifica probele primare
- pregateste probele pentru analiza si pentru conservarea acestora
- Eliberează Buletinul de analiză
- Elimina deseurile medicale

5.5 INFIRMIERA

- Execută şi întreţine curăţenia în laborator.
- Colectează şi depozitează reziduurile de probe şi deşeurile auxiliare, conform instrucţiunilor de lucru.

6. ÎNREGISTRĂRI

Work list
Buletin de analiză, cod FGL-5.8-01
Registru valori de alertă, cod RGL-5.8-01
Grafice de control
Rezultatele controlului intern si extern de calitate

7. ANEXE
Anexa 1 - Tabel cu valori de referinţă
Anexa 2 - Tabel cu valori de alertă (critice)

Anexa 1 –PS-B5-01 - TABEL CU VALORI DE REFERINŢĂ

NR CRT	DENUMIRE ANALIZĂ	CATEGORIE POPULAŢIE	INTERVAL DE REFERINTA	UNITATE DE MĂSURĂ
1	GLUCOZA (sange venos)		70 - 115	mg/dl
3	GLUCOZA (urina 24h)		ABSENT	g/24 h
4	UREE (ser, plasma)		10 - 50	mg/dl
5	UREE (urina 24h)		20 - 35	g/24h
6	CREATININA (ser, plasma)	barbati	0.6-1.1	mg/dl
		femei	0.5-0.9	mg/dl
7	ACID URIC	barbati	3.4 - 7.0	mg/dl
		femei	2.4 - 5.7	mg/dl
8	PROTEINE TOTALE	copii< 3 ani	54 - 87	g/l
		adulti	67 - 87	g/l
9	BILIRUBINA TOTALA		0.2 - 1.0	mg/dl
10	BILIRUBINA DIRECTA		0.0 - 0.25	mg/dl
11	COLESTEROL TOTAL	adulti	< 200	mg/dl
12	HDL - COLESTEROL DIRECT		40 - 66	mg/dl
13	LDL - COLESTEROL DIRECT		< 159	mg/dl
14	TRIGLICERIDE		< 150	mg/dl
15	CALCIU TOTAL		8.1 - 10.4	mg/dl
16	CALCIU IONIC		4 - 5.6	mg/dl
17	MAGNEZIU		1.7 - 2.7	mg/dl
18	FIER	femei	37 - 148	µg/dl
		barbati	59 - 158	µg/dl
19	TGO/AST (aspartataminotransferaza)	barbati	< 37	u/l
		femei	< 31	u/l

NR CRT	DENUMIRE ANALIZĂ	CATEGORIE POPULAŢIE	INTERVAL DE REFERINTA	UNITATE DE MĂSURĂ
20	AMILAZA (ser)		28 - 100	u/l
21	AMILAZA(urina)		< 460	u/l
23	TGP/ALT	femei	< 31	u/l
		barbati	< 40	u/l
24	GGT (gama glutamil transpeptidaza)	barbati	11 - 50	u/l
		femei	7 - 32	u/l
25	FOSFATAZA ALCALINA	copii	< 650	u/l
		adulti	98 -279	u/l

Anexa 2 – PS-B5-01 - Tabel cu valori de alertă (critice)

NR CRT	DENUMIRE ANALIZĂ	CATEGORIE POPULAŢIE	INTERVAL DE REFERINTA	VALORI DE ALERTA(CRITICE)	U.M.
1	GLUCOZA (sange venos)		75 - 115	<40 >300	mg/dl
2	HEMOGLOBINA GLICOZILATA		nediabetici: 4 - 6 diabet controlat: 6 - 8 diabet necontrolat: >8	>12	%
3	GLUCOZA (urina 24h)		ABSENT	-	g/24 h
4	UREE (ser, plasma)		15 - 50	150	mg/dl
5	UREE (urina 24h)		20 - 35	-	g/24h
6	CREATININA (ser, plasma)	barbati	0.6 - 1.1	2	mg/dl
		femei	0.5 – 0.9	2	mg/dl
7	ACID URIC	barbati	3.4 - 7.0	10	mg/dl
		femei	2.4 - 5.7	10	mg/dl
8	PROTEINE TOTALE (ser)	copii<3 ani	54 - 87	48-90	g/l
		adulti	67 - 87	50-90	g/l
9	BILIRUBINA TOTALA		0.2 - 1.0	3	mg/dl
10	BILIRUBINA DIRECTA		0.0 - 0.25	-	mg/dl
17	COLESTEROL TOTAL		< 200	300	mg/dl
18	HDL - COLESTEROL DIRECT		40 - 66	< 25	mg/dl
19	LDL - COLESTEROL DIRECT		< 159	>200	mg/dl
20	TRIGLICERIDE		< 150	200	mg/dl
21	CALCIU TOTAL		8.1 - 10.4	< 7 >11.5	mg/dl
22	MAGNEZIU		1.7 - 2.7	< 1.3	mg/dl
23	FIER	barbati	59 - 158	<10 >300	µg/dl
		femei	37 - 145	<10 >300	µg/dl
24	TGP/ALT (alaninaminotransferaza)	barbati	< 40	150	u/l

NR CRT	DENUMIRE ANALIZĂ	CATEGORIE POPULAŢIE	INTERVAL DE REFERINTA	VALORI DE ALERTA(CRITICE)	U.M.
		femei	< 31	150	u/l
25	TGO/AST (aspartataminotransferaza)	barbati	< 37	150	u/l
		femei	< 31	150	u/l
26	AMILAZA (ser)		28 - 100	200	u/l
27	GGT (gama glutamil transpeptidaza)	barbati	11 – 50	180	u/l
		femei	7 – 32	150	u/l
28	FOSFATAZA ALCALINA	adulti	98 – 279	400	u/l
		copii	< 650	1500	u/l

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICĂ
EXAMENUL COMPLET DE URINĂ

Cod PSL-B5-02
Editia 1, Revizia 0
Din data de
01.05.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr Rodica Fantanaru

VERIFICAT
Responsabil Calitate
As.Lorena Zaborila

Elaborat:
Sef compartiment biochimie
Chim princ. Valentina Holban

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Biochimie	2.		Chim prin. Valentina Holban					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1. SCOP SI DOMENIU DE APLICARE 5

2. DOCUMENTE DE REFERINTA 5

3.DEFINITII SI ABREVIERI 5

3.1.Definitii..... 5

3.2. Prescurtari 5

4.DESCRIEREA PROCEDURII 6

5.RESPONSABILITATI……8

6.INREGISTARI SI ANEXE……9

1.SCOP ŞI DOMENIU DE APLICARE

Procedura descrie următoarele modalităţi de investigare a funcţiei excretorii renale: examenul sumar de urină, analiza microscopică a sedimentului urinar. Procedura se aplică în cadrul departamentului de biochimie.

Semnificaţie clinică:

Sedimentul urinar poate fi:

- organizat: celule epiteliale, hematii, leucocite, cilindrii, clilindroizi, pseudocilindrii, floră microbiană, paraziţi, mucus, levuri
- neorganizat: substanţe de natură organică (acid uric, cistină, leucină, tirozină) sau de natură minerală (fosfaţi, carbonaţi, oxalaţi) care în funcţie de modificările de diureză, pH sau regim alimentar precipită sub formă cristalină sau amorfă.

Valori de referinţă pentru sedimentul urinar:

Nr crt	Elemente din sedimentul urinar	Valori de referinţă
1	Nr cilindrii/câmp (40x)	Absenţi (nu se specifică pe buletin când sunt absenţi)
2	Nr cristale şi originea/câmp (40x)	Absente (nu se specifică pe buletin când sunt absente)
3	Bacterii/câmp (40x)	Absente (nu se specifică pe buletin când sunt absente)
4	Leucocite/câmp (40x)	<8/câmp
5	Hematii/câmp (40x)	<3/câmp
6	Celule epiteliale plate (40x)*	<3/câmp

Valoarea diagnostică a celulelor epiteliale este limitată. Aspectul celulelor variază în raport cu regiunea din care provin: celulele epiteliale plate – vezica urinară; celulele cilindrice, alungite – uretră; celule mici, rotunde, ovale sau poligonale – căile urinare superioare sau tubii renali.

2.DOCUMENTE DE REFERINŢĂ

2.1. EN ISO/CEI: 15189/2007 - Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă
2.2. SR EN ISO/TR 22869 - Laboratoare medicale. Ghid pentru implementarea în laboratoare a ISO 15189: 2003
2.3.Dumitraşcu, V., Gîju, S. şi colaboratorii, *Sedimentul urinar*, Ed. de Vest, Timişoara, 2007
2.4. RoEQALM - Recomdari pentru standardizarea analizei sumarului de urina si sedimentului urinar 2008
2.5. Comoroşanu, S., Mitrică-Kondi, N., *Laborator clinic. Biochimie*, Ed. Medicală, Bucureşti, 1981
2.6. Manualul Calităţii laboratorului, cod MC-01
2.7. Manualul de recoltare a probelor biologice, cod MRP
2.8. Manual de utilizare a analizorului de urini Dirui – H100

3.DEFINIŢII ŞI ABREVIERI

3.1. DEFINIŢII

3.1.1. Examen sumar de urină - analiza fizico-chimică a urinii

3.1.2. Sediment urinar - depozitul format pe fundul eprubetei cu urină, după 2 ore de menţinere a probei în repaus, pe masă, sau după centrifugarea probei timp de 5 minute

3.1.3. Proteinurie - eliminarea urinară de proteine, inclusiv albumină (absentă la subiecţii sănătoşi, < 124mg/24ore).

3.1.4. Hematurie - eliminarea sîngelui în urină, sub formă de hematii; dacă acestea au fost lizate, se foloseşte termenul de hemoglobinurie.

3.1.5. Leucociturie - eliminarea urinară de leucocite peste pragul normal de 12/μL.

3.2. ABREVIERI

LPF - Low Power Field (cîmpul microscopic dat de obiectivul x20)
HPF - High Power Field (cîmpul microscopic dat de obiectivul x40)

FCR - forta centrifuga relativa
ID - număr de înregistrare atribuit unui singur pacient odată cu recepţionarea şi recoltarea probelor biologice. Acest număr se regăseşte pe fiecare eşantion provenit de la un pacient.
GLU - glucoză
PRO - proteine
BIL - bilirubină
URO - urobilinogen
SG - (standard gravity) densitatea urinii
BLD - (blood) hematii sau hemoglobină
KET - corpi cetonici
NIT - nitriţi
LEU - leucocite

4.DESCRIEREA PROCEDURII

4.1. RESURSE

4.1.1. Resurse umane
- biolog principal;
- chimist;
- biochimist;

4.1.2.Materiale necesare

- **analizor semiautomat pentru urina *Dirui H-100***

- strip-uri pentru analiza fizico-chimică a urinii H10 de la firma DIRUI Industrial Co., Ltd. (China), care analizează simultan 10 parametri: glucoză, proteine, bilirubină, urobilinogen, densitate, pH, hematii, corpi cetonici, nitriţi şi leucocite

- strip-uri de calibrare CheckSample H100

- urini de control: Urinalysis control Negative (flacon 8 ml, recondiţionat), Urinalysis control Pozitive (flacon 8 ml, recondiţionat), DIRUI Industrial Co., Ltd. (China)

- eprubete curate, din sticlă, cu dimensiuni de 10x12mm
- stativ pentru eprubete
- lame şi lamele (22x22mm) pentru microscop
- centrifugă
- microscop
- pipete semiautomate de 20-100µL
- vîrfuri pentru pipete
- hîrtie de filtru
- marker
- vas cu soluţie dezinfectantă

4.2.EXAMENUL SUMAR DE URINĂ

Recipientele cu urină (recoltate dimineaţa, la prima emisie, după o toaletă genitală prealabilă, aşa cum se precizează în procedura Manualul de recoltare a probelor biologice), se aşează pe masa de lucru în ordinea crescătoare a numerelor de înregistrare. Pe eprubete curate şi uscate, din sticlă, se notează numerele eşantioanelor de analizat (numere de identificare ale pacienţilor), iar eprubetele se aşează în stativ, în ordinea crescătoare a numerelor de înregistrare.

4.2.1. Control de calitate

La inceputul zilei de lucru, se verifica cititorul cu urina de control cu valori negative si pozitive. Se verifica daca rezultatele se incadreaza in specificatia producatorului.

4.2.2. Citirea probelor

Probele se citesc urmand pasii stabiliti in manualul de operare si in IL-PS-B-02-01.

Rezultatul afişat şi imprimat de analizor precizează, pentru fiecare parametru analizat, atît valoarea obţinută pentru eşantionul respectiv, cît şi intervalul de normalitate, astfel:

Parametru	**Scor şi/sau valoare obţinută**	**Interval de normalitate**

Glucoză	Negativ, +/-(50mg/dL), +(100mg/dL), ++(250mg/dL), +++(500mg/dL), ++++(1000mg/dL)	Negativ (urme fine, nedetectabile)
Proteine	Negativ, +/-(15mg/dL), +(30mg/dL), ++(100mg/dL), +++(300mg/dL), ++++(1000mg/dL)	Negativ
Bilirubină	Negativ, +(0,5mg/dL), ++(2mg/dL), +++(6mg/dL), ++++(>6mg/dL)	Negativ
Urobilinogen	Normal, +(2mg/dL), ++(4mg/dL), +++(8mg/dL), ++++(>8mg/dL)	Negativ (cantităţi mici, < 17µmol/L)
pH	5,6,7,8 sau 9	5-6
Densitate	1,000; 1,005; 1,010; 1,015; 1,020; 1,025; 1,030; >1,030.	1,015- 1,030
Hematii/Hemoglobină	Negativ, +,++,+++	Negativ
Corpi cetonici	Negativ, +/-(5mg/dL), +(15mg/dL), ++(40mg/dL),+++(80mg/dL), ++++(150mg/dL)	Negativ
Nitriţi	Negativ, +,++	Negativ
Leucocite	Negativ, 25/µL, 75/µL, 250/µL, 500/µL	Negativ

Rezultatele printate se pastreaza in laborator. Rezultatele sunt transferate in softul medical, automat sau manual.

4.3. SEDIMENTUL URINAR CALITATIV

Eprubetele cu probe de urină folosite la efectuarea examenului sumar se centrifughează 5 minute la 1500 turaţii/minut, se aruncă supernatantul (aproximativ 9 mL din cei 10 existenţi), iar depozitul obţinut se omogenizează prin agitare. Se

numerotează lame de microscop cu ID-urile corespunzătoare şi se pipetează cîte 50µL de sediment urinar din fiecare eprubetă pe lama cu acelaşi număr. După fiecare pipetare, se aruncă vîrful de pipetă folosit în containerul pentru deşeuri. Se acoperă picătura cu o lamelă şi se citeşte rezultatul la microscop, cu obiectivul x20, apoi cu obiectivul x40.

Cu obiectivul mic se caută elemente de dimensiuni mari: celule epiteliale plate, rotunde sau în rachetă, săruri, cristale (fosfaţi, oxalaţi, uraţi), floră microbiană, levuri, *Trichomonas vaginalis*, mucus, cilindri hialini.

Cu obiectivul x40 se verifică prezenţa leucocitelor şi a hematiilor.

În mod normal, sedimentul urinar poate conţine:

- celule epiteliale plate <20/LPF
- cilindri hialini<2/LPF
- leucocite<2/HPF
- hematii<1/HPF
- celule epiteliale renale şi tubulare<5/HPF
- prezenţa spermatozoizilor în urină poate fi cauză de falsă proteinurie.

Prezenţa acestor elemente în număr mai mare sau a celorlalte elemente (indiferent de număr) este semn patologic şi se exprimă prin termeni ca "rare", "relativ frecvente", "frecvente", "depozit".

Proteinuriile de >50mg/dl se verifică prin metoda cu acid sulfosalicilic: într-o eprubetă se piteptează 4 ml urină peste care se adaugă 4-5 picături de acid sulfosalicilic 20%. Se agită uşor şi se lasă 10 minute în repaus. În funcţie de cantitatea de proteine conţinute, urina devine opalescentă sau apare un precipitat, situaţie în care proteinele pot fi dozabile.

Modalitati de exprimare a sedimentului urinar organizat si neorganizat conform standardizarii ROEQALM (pag 19-20):

Elemente - sediment organizat	Modalitati de exprimare
Eritrocite	1-2 pe camp = FOARTE RARE 3-4 pe camp = RARE 5-10 pe camp = RELATIV FRECVENTE 11-25 pe camp = FRECVENTE

	26-40 pe camp = NUMEROASE peste 40 pe camp = DEPOZIT
Leucocite	1-2 pe camp = FOARTE RARE 3-4 pe camp = RARE 5-10 pe camp = RELATIV FRECVENTE* 11-25 pe camp = FRECVENTE* 26-40 pe camp = NUMEROASE* peste 40 pe camp = DEPOZIT
Celule tubulare renale** si celule tranzitionale (uroteliale)	0-1 celule pe camp = FOARTE RARE 2-3 celule pe camp = RARE 4-6 celule pe camp = RELATIV FRECVENTE > 6 celule pe camp = FRECVENTE
Celule scuamoase (epiteliale plate)	Se apreciaza pe camp***: FOARTE RARE, RARE, RELATIV FRECVENTE, FRECVENTE, NUMEROASE
Celule epiteliale cu suspiciune de atipii	Prezente celule epiteliale cu suspiciune de atipii

* Se poate mentiona „izolate si gruparte"
** Daca laboratorul are dificultati in diferentiere celulelor tranzitionale de celulele tubulare renale se poate folosi termenul de „celule rotunde mici"
*** Se poate mentiona „izolate si in placarde"

Elemente - sediment neorganizat	Modalitati de exprimare
Cilindri (hialini, celulari, granulosi, cirosi, grasosi, cilindri cu depuneri de cristale)	0-2 pe camp = FOARTE RARI 3-4 pe camp = RARI 5-10 pe camp = RELATIV FRECVENTI 11-20 pe camp = FRECVENTI > 20 pe camp = NUMEROASI
Fragmente epiteliale (întotdeauna patologice)	PREZENTE
Flora microbiana	NEDECELABIALA*, RARA, FRECVENTA,

Levuri Paraziti Filamente uretrale, Mucus Spermatozoizi	ABUNDENTA RARE, FRECVENTE, NUMEROASE PREZENTI RARE, FRECVENTE, ABUNDENTE RARE, FRECVENTI, NUMEROSI
Cristale	1-2 pe camp = FOARTE RARE 3-4 pe camp = RARE 5-10 pe camp = RELATIV FRECVENTE** 11-20 pe camp = FRECVENTE** 21-40 pe camp = NUMEROASE** peste 40 pe camp = DEPOZIT

* In cazul florei microbiene nu se utilizeaza termenul „ABSENTA"
** Se poate mentiona „izolate si agregate"

4.6 ACTIVITĂŢI FINALE

Se introduc materialele consumabile (lame, lamele, eprubete) în vasul de polietilenă cu soluţie dezinfectantă, apoi se clătesc cu apa distilata şi se şterg cu o cîrpă moale, se aruncă urocultoarele, strip-urile folosite în containerul pentru deşeuri, se aruncă apoi şi mănuşile de latex ale tehnicianului în container, se deconectează de la sursa de curent microscopul, centrifuga şi analizorul de urini.

Se verifica rezultatele si apoi se trec in buletinul de analiza si se valideaza de catre RA.

5.RESPONSABILITĂŢI

5.1. RESPONSABILUL DE ANALIZĂ

- execută examenul microscopic al sedimentului urinar
- numără şi calculează elementele pentru sedimentul urinar cantitativ
- verifică rezultatele în caietul de lucru
- trece rezultatele în computer
- verifică, valideaza rezultatele

5.3. EXECUTANTUL:

- execută examenul sumar de urină
- pregăteşte examenul microscopic pentru sedimentul urinar
- trece rezultatele în caietul de lucru
- arhiveaza rezultatele QC si ale probelor

6. ÎNREGISTRĂRI

Registrul de lucru sediment urinar, cod RSL-B5-02-01

7. ANEXE

-

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICĂ

DETERMINAREA ELECTROLITILOR PRIN METODA I.S.E. DIRECT

Cod PS-B5-01
Editia 1, Revizia 0

Din data de
01.05.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr Rodica Fantanaru

VERIFICAT
Responsabil Calitate
As.Lorena Zaborila

Elaborat:
Sef compartiment biochimie
Chim princ. Valentina Holban

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment: Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Biochimie	2.		Chim prin. Valentina Holban					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1. SCOP SI DOMENIU DE APLICARE 5

2. DOCUMENTE DE REFERINTA 5

3.DEFINITII SI ABREVIERI 5

3.1.Definitii 5

3.2. Prescurtari 5

4.DESCRIEREA PROCEDURII 6

4.1. Semnificatie clinica 6

4.2. Principiul metodei.....6

4.3. Resursele necesare……..6

4.4. Produsul biologic de analizat……..6

4.5.Descrierea activitatii……..6

4.6.Activitati finale……7

4.7.Valori de referinta……...7

5.RESPONSABILITATI……8

6.INREGISTARI SI ANEXE……9

1. SCOP ŞI DOMENIU DE APLICARE

Prezenta procedura specifică descrie metoda de determinare a concentraţiei ionilor de sodiu, potasiu, clor, calciu din lichide biologice din ser.

Această procedură este utilizată de către biolog, biochimist, chimist în Laboratorul Spitalului Clinic de Boli Infectioase „Sf. Parascheva" Iasi

2. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ

1. SR EN ISO/CEI: 15189:2007 - Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă
2. SR EN ISO/TR 22869 - Laboratoare medicale. Ghid pentru implementarea în laboratoare a ISO 15189 : 2003
3. SR EN ISO 15190 : 2005 - Laboratoare medicale. Cerinţe pentru securitate
4. Manualul calităţii laboratorului, cod MC-01
5. Manualul de operare si de service al analizatorului Diestro 103AP
6. Marcela Zamfirescu-Gheorgiu, Aurora Popescu, Tratat de biochimie medicală, vol.I şi II, Ed. Medicală, Buc. 1991
7. Iulian Mincu, Nicolae Hâncu, Bolile metabolice în practica medicală, Cluj- Napoca, Ed. Dacia, 1981
8. Jacques Wallach, "Interpretarea testelor de diagnostic", editie internaţională, Editura Ştiintelor Medicale
9. Prospect control DIESTRO-TRILEVEL cod IN 0750
10. – Manualul de recoltare a probelor biologice

3. DEFINIŢII SI ABREVIERI.TERMINOLOGIE

3.1. DEFINIŢII

- *Specificitatea analitică*: termen care exprimă calitativ măsura în care alte substanţe interferă cu determinarea unei substanţe potrivit unei proceduri date. Substanţele interferente pot fi endogene sau exogene.

- *Specificitatea clinică* este definită ca probabiltatea ca prin testare să se obţină un rezultat negativ în absenţa analitului specific.

- *Senzitivitatea clinică* este definită ca probabilitatea ca prin testare să se obţină un rezultat pozitiv în prezenţa analitului respectiv.

- *Acurateţea (exactitatea) măsurării*: apropierea (concordanţa) dintre rezultatul unei măsurări şi valoarea reală („true value") a măsurandului.

- *Limita de detecţie (sensibilitate)* : rezultat singular minim care, cu o anumită probabilitate, poate fi distins (diferenţiat) de valoarea blancului. Limita defineşte punctul de la care analiza devine posibilă şi aceasta poate fi diferită de limita inferioară a domeniului analitic determinabil.

- *Calibrare:* ansamblul de operaţii care stabilesc în condiţii specificate relaţia dintre valorile unei mărimi indicate de un aparat de măsura sau un sistem de măsurare sau dintre valorile reprezentate de o măsură sau un material de referinţă şi valorile corespunzătoare realizate cu etaloane.

- *Validare:* confirmarea, în baza unei examinări şi pe baza punerii la dispoziţie a unei dovezi că cerinţele particulare pentru o utilizare specială sunt satisfăcute.

- *Trasabilitatea*: o proprietate atribuită unui rezultat test sau valoare măsurată care poate fi raportată la o referinţă fixată, de obicei standarde naţionale sau internaţionale, printr-o serie continuă de ecuaţii (determinări) ale căror incertitudini sunt cunoscute.

- *Incertitudinea de măsurare*:
  - estimaţie, caracterizând intervalul de valori în interiorul căruia se găseşte valoarea adevărată a măsurandului. (VIM, ediţia I, 1984)
  - limitele intervalului de valori, care, cu o anumită probabilitate include valoarea adevărată a măsurandului.

3.2. ABREVIERI

- **Na -** sodiu
- **K** – potasiu
- **Cl** – clor
- **Ca** – calciu
- **QC** - control de calitate
- **cNa$^+$ -** concentratia sodiului
- **Cal. –** calibrare
- **Meas. –** masurare
- **Serv.** – service
- **Cap.** – capilar
- **Esc.** – tasta ,,escape" de iesire din meniu unde se afla utilizatorul sau de anulare a unei comenzi
- **cK$^+$(P) –** concentratia potasiului in plasma

- **cK^+ (aP) –** concentratia potasiului in sange arterial
- **cNa^+(P) –** concentratia sodiului in plasma
- **cNa^+(aP) -** concentratia sodiului in sange arterial
- **cCl^-(P) –** concentratia clorului in plasma
- **cCl^-(aP) –** concentratia clorului in sangele arterial
- **cCa^{++}(P) –** concentratia calciului in plasma
- **cCa^{2+}(aP) -** concentratia calciului in sange arterial
- **I.S.E.** – Ion Selective Electrode
- **IFCC –** International Federation of Clinical Chemistry
- **EDTA** – acid etilendiaminotetraacetic
- **ADC –** Analog to Digital Conversion signal

4. DESCRIEREA PROCEDURII

4.1. SEMNIFICAŢIA CLINICĂ

4.1.1 SODIUL

Organismul uman are un nivel total de sodiu de aproximativ 60 mmol/kg, din care majoritatea se găseste în oase şi extracelular. Nivelul plasmatic (aproximativ 140 mmol/l) este reglat prin conţinutul în sodiu al plasmei, apa şi potasiul intracelular. Deci, concentraţia mare a sodiului în plasmă se datorează deshidratarii.

Sodiul reprezinta aproximativ 90% din cationii anorganici din plasma, fiind responsabil pentru aproape jumătate din osmolaritatea plasmei.

Valori de referinţă: Ser 135 – 148 mmol/l.

Valori scazute ale sodiului in ser pot fi cauzate de:

- aport mai mare de apa decat de sodiu: insuficienta cardiaca, insuficienta renala, boli ale ficatului, sindrom nefrotic, crestere a secretiei de ADH, consum excesiv de apa.
- deficit de sodiu mai mare decat de apa: voma, diaree, obstructie intestinala, tratament diuretic, arsuri, insuficienta suprarenala (hiperaldosteroism).
- circuitul sodiului din spatiul extracelular in cel intracelular: insuficienta suprarenala (hiperaldosteroism), sindrom anemic hemolitic.
- pseudo-hipernatremie: hiperglicemie, hiperlipemie, hiperglobulinemie.

Valori crescute ale sodiului in ser pot fi cauzate de:

- aport mai mare de sodiu decat de apa: aport excesiv de sodiu, administrare de clorura de sodiu sau bicarbonat de sodiu, hipertonice, hiperaldosteroism primar.
- deficit de apa mai mare decat de sodiu: transpiratie excesiva(exercitii, febra, caldura ambientala), arsuri si anumite diarei si vome prin care se pierde mai multa apa decat sodiu, ca si in diureza osmotica, hiperventilatie, diabet insipid, scaderea aportului de apa.
- steroizi.

4.1.2 POTASIUL

Organismul uman are o cantitate totala de 3000 – 4000 mmoli de potasiu din care majoritate se gaseste intracelular. Plasma (si lichidul extracelular) contine numai 4.0 mmmol/l, totalizand 50 mmoli (lichidul extracelular este aproximativ 12l). Cu toate ca potasiul extracelular constituie numai 1-2% din potasiul total, este de o importanta capitala deoarece una din functiile principale este de a media reglarea intregului echilibrul al potasiului din organism. Un nivel normal al potasiului este esential pentru reglarea functiei cardiace. Valorile care nu se incadreaza intre 2.5 si 7.0 mmol/l sunt letale.

Valori de referinta: Ser 3.7 – 5.3 mmol/l.

Valori scazute ale potasiului in ser pot fi cauzate de:

- circuitul potasiului din spatiul extracelular in cel intracelular: alcaloza respiratorie sau metabolica, scaderea insulinei plasmatice, diureza fortata (tratament cu diuretice), hipercalcemie si diabetus mellitus.

- aport mai mic de potasiu: dieta saraca in potasiu, alcoolism, anorexie nervoasa.

- cresterea pierderii gastrointestinale: diaree, voma, drenaj gastrointestinal, malabsorbtie, abuz de laxative sau clisme.

- cresterea pierderii urinare: hiperaldosteronism primar si secundar, hiperplazie suprarenala, sindromul Bartter, anticonceptionale orale, sindrom adrenogenital, boli ale rinichilor.

- scaderea magneziului.

Valori crescute ale potasiului in ser pot fi cauzate de:

-pseudohipercalemie, hemoliza, leucocitoza.

-miscari din spatiul intracelular in cel extracelular: acidoza, traumatisme severe, hipoxie celulara, deficienta de insulina.

-aport mare de potasiu: dieta bogata in potasiu, suplimente orale cu potasiu, administrare intravenoasa de potasiu, transfuzie cu sange invechit.

-excretie diminuata de potasiu: insuficienta renala, hiperaldosteronism (insuficienta suprarenalelor), diuretice care blocheaza secretia potasiului, defecte primare ale tuburilor renale care afecteaza secretia potasiului.

-acidoza metabolica endogena.

1.1.3 CLORUL

Ionul de clor este anionul principal al corpului din lichidul extracelular. Nivelul plasmatic este de aproximativ 100 mmol/l, reprezentand cea mai mare parte din ionii anorganici. Concentratia de clor prezinta variatii datorate aportului de sare. Sodiul si clorul impreuna reprezinta majoritatea componentelor plasmatice osmotic active. Rinichiul joaca un rol important in reglarea clorului. Clorul acompaniaza o mare parte din sodiul filtrat de glomerul si este de asemeni activ in schimburile clor – bicarbonat.

Valori de referinta: Ser 98 – 109 mmol/l.

Clorul, ca parametru luat individual este de o importanta scazuta in majoritatea situatiilor. Totusi, valori scazute pot cauza spasme musculare, apatie sau anorexie. Valorile crescute pot determina acidoza metabolica hipercloremica.

Importanta majora a clorului este cea a descoperirii deficitului de anioni.

Modificarile electroliţilor în diferite stări fiziopatologice:

	SANGE		
	SODIU	POTASIU	CLOR
Emfizem pulmonar	N	N	S
Insuficienta cardiaca	N sau C	N	S

congestiva			
Transpiratie excesiva	S	N	S
Diaree	S	S	S
Stenoza pilorica	S	S	S
Deshidratare	S	N	C
Inanitie	C	S	N
Malabsorbtie	N	S	N
Intoxicatie cu salicilati	S	N	C
Hiperaldosteronism primar	N	S	S
Insuficienta corticosuprarenaliana	S	C	S
Diabet insipid	N sau C	N	C
Acidoza diabetica	S	N sau C	S
Administrare de diuretice mercuriale	S	S	S
Administrare de diuretice tiazidice	S	S	S
Administrare de clorura de amoniu	S	S	C
Administrare de acetazolamida (Diamox)	S	S	C
Acidoza renala tubulara	S	S	C
Insuficienta renala cronica	S	N sau S	S sau N
Insuficienta renala acuta	S	C	C

*N = valori normale; C = valori crescute; S = valori scazute.

4.1.4 CALCIUL IONIC

Calciul ionic din plasma este partea metabolic activa a calciului total, constituind aproape 50% din calciul total. Calciul total din plasma este legat de proteine (in special albumina) 40% si restul de 10% de anioni de bicarbonat, citrat, fosfat si lactat. Legarea de proteine depinde de pH. Calciul ionizat este necesar pentru o serie de procese enzimatice si mecanisme de transport membranar. Joaca deci un rol cheie in coagularea sangelui, cresterea celulara, transmiterea neuro-musculara si o serie de alte functii esentiale vietii.

Valori de referinta: 4.0 – 5.6 mg/dl (1.00– 1.40 mmol/l).

Valori scazute ale calciului ionic pot fi determinate de:

-alcaloza.
-insuficienta renala.
-insuficienta circulatorie acuta.
-lipsa vitaminei D.
-hipoparatiroidism.
Valori crescute ale calciului ionic pot fi cauzate de:
-cancer.
-tireotoxicoza.
-pancreatita.
-imobilizare.
-hiperparatiroidism.

4.2. DESCRIEREA METODELOR DE ANALIZĂ UTILIZATE (principiul metodei)

Metoda ISE (Ion Selective Electrode) masoara electrolitii prin doua tehnologii diferite, direct si indirect, cunoscute ca Direct ISE si Indirect ISE.

Metoda ISE directa

Masurarea este efectuata direct pe ser.

Metoda ISE directa masoara activitatea electrolitilor in plasma (mmol/kg H_2O) sau concentratia in plasma (mmol/l). Activitatea electrochimica a ionilor in apa se transforma in concentratia corespunzatoare cu ajutorul unui factor specific ionilor. Acest lucru este aplicabil doar la un nivel dat de concentratie. Folosirea acestui factor asigura faptul ca metoda ISE directa reflecta o situatie curenta, activitatea cu relevanta clinica, indiferent de valorile proteinelor sau/si a lipidelor. Cu toate acestea, rezultatul este in mod traditional numit ,,concentratie". Aceasta conversie are la baza recomandarile expertilor IFCC privind pH-ul si gazele din sange pentru a preveni confuzia datorata existentei celor doua tipuri de rezultate ale ionilor.

Rezultatele obtinute prin sistemul ISE direct sunt bine corelate cand probele au un continut normal de proteine si lipide. Aceasta bineanteles necesita eliminarea erorilor preanalitice.

Analizorul automat determina electrolitii prin metoda ISE directa care se bazeaza pe proprietatile captatorilor sau senzorilor (electrozilor) de a fi selectivi pentru un ion specific din solutie.

Acest lucru este realizat deoarece membranele ISE dezvolta un potential masurat in comparatie cu un electrod de referinta stabil, cu potential constant, aflat in legatura cu activitatea acestui ion particular pentru care este selectiv respectivul electrod.

Acest potential este dat de ecuatia lui Nernst:

$E = E^0 \pm (RT/nF) \ln a_i$ (+ pentru cationi si – pentru anioni)

Dar $a_i = f_i\ c_i$, atunci

$$E = E^0 \pm (RT/Nf)\ \ln (f_i\ c_i)$$

Unde:
E = potentialul electric masurat
E^0 = potentialul electric (constant) care depinde de sistemul de masurare
a_i = activitatea electrolitului
R = constanta generala a gazelor
T = temperatura
n = valenta electrolitului
F = constanta lui Faraday
c_i = concentratia electrolitului
f_i = coeficientul activitatii electrolitului.

Enuntand ecuatia in termenii functiilor analizorului:

$$E = E^0 \pm P \log (f_i\ c_i)$$

Unde:
P = panta ecuatiei electrodului pentru temperatura de lucru. Aceasta este calculata de analizor masurand calibratorii standard A si B si stiind concentratia fiecarui electrolit.

$$E\ (proba) = E^0 + P \log (f_i\ c_i\ proba)$$
$$E\ (standard) = E^0 + P \log (f_i\ c_i\ standard)$$
$$\Delta E = E_{proba} - E_{standard} = P \log (c_i\ proba - c_i\ standard)$$

In final ecuatia care arata concentratia electrolitului este:

$$c_i\ proba = c_i\ standard\ 10^{(\Delta E/P)}.$$

Acesta este algoritmul pentru analizorul Diestro.

Limitele intre care trebuie sa se incadreze panta pentru masurarea electrolitilor sunt urmatoarele: pentru sodiu 25 - 90, pentru potasiu 30 – 80, pentru clor 20 – 80 si pentru calciu 10 – 40.

Intervale de detectie pentru ser:
-sodiu: 40 – 220 mmol/l;
-potasiu: 1 – 30 mmol/l;
-clor: 20 – 250 mmol/l;
-calciu: 0.2 – 5 mmol/l (1 mmol/l = 4 mg/dl);
-litiu: 0.2 – 5 mmol/l.

4.3 RESURSE NECESARE

4.3.1 Echipamente şi accesorii

4.3.1.1 Echipamente

Analizor de electroliti DIESTRO 103 AP

Analizor DIESTRO 103 AP seria 653 produs de “JS Medicina Electrónica SRL”.

- Analizor
- Imprimantă încorporată

4.3.1.2.Accesorii

- Manual de operare si de service - cod
- Tuburi de conectare – cod
- Tubulatura pompa peristaltica - cod
- Tub pentru absorbtia probei –cod
- Adaptoare pentru modul capilar de lucru – cod
- Centrifuga
- Microtuburi cu capac (1,5 ml)
- Hartie termosensibila pentru imprimanta incorporata
- Tifon steril

4.3.2 Reactivi şi alte materiale necesare

- CALIBRATION SOLUTION PACK - cod IN 0101, contine 800 ml calibrator A, 100 ml calibrator B, un recipient pentru reziduri si un microcip cu valorile de concentratie atribuite calibratorilor.
- ISE CLEANING SOLUTION - cod IN 0400, contine 100 ml solutie de hipoclorit de sodiu 10% in apă distilată, pentru curatarea zilnică .
- SODIUM CONDITIONER –cod IN 0600, contine 20 ml de solutie de spalare pentru cazul in care valorile obtinute pentru sodiu nu sunt veridice.

4.3.3 Calibratori şi materiale de control

Analizorul efectuează două tipuri de calibrare: într-un singur punct şi în două puncte.

Calibrarea într-un singur punct este efectuată automat de către analizor în timpul măsurarii probelor şi nu este accesibilă utilizatorului. În acest tip de calibrare este utilizat doar calibratorul A.

Calibrarea în două puncte este executată în mod automat la deschiderea analizorului şi în conformitate cu programul presetat de către operator în analizor (la un interval de timp stabilit) sau ori de câte ori este necesar. Acest tip de calibrare utilizează doi calibratori: A şi B.

Controlul intern – se realizeaza cu ser de control N si P de la Randox (Hum Asy Control, 2, si 3.

4.4 PRODUS BIOLOGIC DE ANALIZAT

Este reprezentat de ser obţinut din eprubeta de biochimie (cu dop roşu), după centrifugare timp de 5min la 3500rpm.

4.4.1 Eşantionare şi procesare

După 30 min, timp în care are loc coagularea completă şi separararea serului de cheag, probele biologice se centrifughează la 3500 rotaţii pe minut, timp de 5 minute.

Analiza se face din serul obţinut prin centrifugarea probei primare, în maxim 2 ore de la recoltare.

După centrifugare, probele sunt verificate pentru a determina dacă sunt corespunzătoare pentru testare. Probele necorespunzătoare sau cele ale căror caracteristici pot influenţa calitatea rezultatelor (ex. ser lipemic, hemolizat, icteric, cantitate insuficientă) sunt identificate şi consemnate în Buletinul de analiza cod FGL-5.8-01, la rubrica „Comentarii".

Calitatea rezultatelor poate fi afectată în cazul în care proba este lipemică, hemolizată, icterică sau prezintă precipitate. De asemenea pot aparea interferenţe datorate tratamentelor administrate anterior recoltarii şi din acest motiv personalul care receptioneaza proba consemnează acest lucru în biletul de trimitere la rubrica aferentă.

Asistentul de laborator recepţionează proba biologică primară, verifică ID-urile de pe eprubetă şi din Formularul de solicitare analize FGL -5.4.1-N si dacă proba secundară (serul) obţinută după centrifugarea probei primare corespunde cantitativ şi calitativ.

Dacă proba nu corespunde cantitativ sau calitativ este informat departamentul de Recoltare, recepţie şi prelevare probe biologice care comunică telefonic beneficiarului necesitatea recoltării unei noi probe biologice.

Criteriile pentru respingerea probei biologice, sunt :

- identificarea necorespunzătoare a probei
- volum de sânge necorespunzător
- folosirea unui tub de recoltare greşit
- transport şi stocare necorespunzătoare a probei
- hemoliza probei care se poate datora unei puncţii venoase dificile sau manevrării necorespunzătoare a probei
- probele hiperlipemice recoltate posprandial sau la mai puţin de 4 ore de la ultima ingestie de alimente.

4.4.2 Eliminare

Probele sunt eliminate conform procedurii – Colectarea, depozitarea şi transportul produselor infectioase.

4.4.4 Informaţii reţinute în computer

Rezultatele si datele despre pacienti sunt stocate in sistemul informatic al laboratorului .

4.5 MOD DE LUCRU (Procedură de lucru)

4.5.1 Activităti pregătitoare

Pregătirea analizorului

La începutul lucrului efectuăm operaţiunea „ Rinse". Această operaţiune de spălare face parte din mentenanţa zilnică şi pregăteşte analizorul pentru măsurarea calibratorilor, controalelor şi probelor. Operatiunea de Rinse aduce standardul A în electrozi, prevenind astfel amestecarea diferitelor substanţe în timpul diferitelor operaţiuni. De asemenea curăţă circuitul înlăturând bulele de aer, cheagurile, mizeria sau alte substanţe care ar putea influenţa corectitudinea rezultatelor analizelor sau controalelor şi calibrărilor.

Operaţiunea de Rinse este executată automat de către analizor sau la cererea utilizatorului.

În mod automat operatiunea de Rinse are loc între măsurarea standardului B şi a standardului A în timpul calibrarii, între măsurarea probei şi a standardului A, precum şi dacă în ultimele 10 minute nu am utilizat analizorul.

La cerere operatiunea de Rinse se realizează urmând etapele (tasta apasata corespunzatoare comenzii de pe ecran):

Tube	Cap.	Urin	**Menu**

↓

Meniul principal

Cal.	**Meas.**	QC	Serv.

↓

Meniul de masurare

Meas.	Mem.	**Rinse**	Esc.

↓

Meniul Rinse

Rinse	Cln	Purge	Esc.

La iniţierea operaţiunii de „Rinse" analizorul se încarcă şi se spală cu standard A. La finalul operatiunii analizorul va afisa meniul Rinse.

Operaţiunea de „Clean" este efectuată o dată la maxim 24 de ore. Dacă depăşim acest interval analizorul afişează pe ecran mesajul „Clean". Apăsăm tasta corespunzatoare, tubul de aspirare iese în exterior şi este introdus int-un microtub continand ISE CLEANING SOLUTION apoi apăsăm tasta „Fill". Dupa ce analizorul s-a oprit din aspirat, ştergem cu un tifon steril, lateral, tubul de aspirare si apasăm tasta „Ready". După finalizarea operaţiunii de Clean analizorul efectuează automat o calibrare în doua puncte. Când rezultatul calibrării este afişat analizorul este gata de utilizare.

Operaţiunea de Clean la cererea operatorului o efectuăm în următorul mod (tasta apasata corespunzatoare comenzii de pe ecran):

Tube	Cap.	Urin	**Menu**

↓

Meniul principal

Cal.	**Meas.**	QC	Serv.

↓

Meniul de masurare

Meas.	Mem.	**Rinse**	Esc.

↓

Meniul Rinse

Rinse	**Cln**	Purge	Esc.

↓ Introducerea tubului de aspirare într-un microtub cu ISE CLEANING SOLUTION

Meniul Clean

Fill	Esc.

↓ Ştergerea tubului de aspirare, lateral, cu un tifon steril după încetarea aspirării

Meniul Clean

Ready	Esc.

Spălarea cu SODIUM CONDITIONER o efectuăm urmând aceiaşi paşi ca pentru operatiunea de Clean, înlocuind ISE CLEANING SOLUTION cu SODIUM CONDITIONER.

4.5.2 Măsurarea propriuzisă

Măsurarea electroliţilor din ser, plasmă, sange integral (tasta apasata corespunzatoare comenzii de pe ecran):

Meniul principal

Cal.	**Meas.**	QC	Serv.

↓

Meniul de masurare

Meas.	Mem.	Rinse	Esc.

↓

Tube	Cap.	Urin	Menu

↓

Meniul de masurare

Fill	**Info**	Sens	Esc.

↓ Introducere ID proba

<==>	**ˆ**	**ˇ**	**Meas.**
Mutarea cursorului	Crestere	Descrestere	Masurare

↓ Introducerea tubului de aspirare in vacutainerul sau microtubul cu proba

Meniul de masurare

Fill	Info	Sens	Esc.

↓ Stergerea tubului de aspirare lateral cu un tifon steril

Meniul de masurare

Ready	Esc.

↓

Masurarea efectiva

↓

Printarea rezultatelor

Măsurarea electroliţilor din urină

Probele de urina se dilueaza 1/5 cu diluent ISE Urine Diluent cod IN 0300. Analizorul măsoara sodiu, potasiu şi clor din urina din 24 de ore.

Determinarea I.S.E. din urina (tasta apasata corespunzatoare comenzii de pe ecran):

Tube	Cap.	**Urin**	Menu

↓ Introducerea dilutiei efectuate

<==>	**ˆ**	**ˇ**	**Meas.**
Mutarea cursorului	Crestere	Descrestere	Masurare

↓

Meniul de masurare

Fill	**Info**	Sens	Esc.

↓ Introducere ID proba

<==>	^	ˇ	Meas.
Mutarea cursorului	Crestere	Descrestere	Masurare

↓

Introducerea tubului de aspirare in microtubul cu proba

Meniul de masurare

Fill	Info	Sens	Esc.

↓

Stergem tubul de aspirare lateral cu un tifon umectat cu I.S.E. CLEANING SOLUTION

Meniul de masurare

Ready	Esc.

↓

Masurarea efectiva

↓

Printarea rezultatelor

Indicele ,,O” din dreptul rezultatelor semnalează că proba măsurată este urină.

4.5.3 Întreţinerea echipamentelor

Operaţiunile de întreţinere ale analizorului Diestro 103 AP sunt efectuate de către utilizator şi de către service conform planului de mentenanţă.

Modul de completare a acestor înregistrări este descris în procedura generală PG-5.3 – Echipament de laborator.

4.5.4. Mesaje de eroare

Eroare	Descriere	Cauza posibilă	Efect	Acţiune
Not CALIB	Electrod necalibrat	Analizam caracterul care urmeaza dupa mesajul *Not CALIB*	Electrolitul respectiv nu poate fi masurat	Analizam caracterul care urmeaza dupa mesajul *Not CALIB* sau procedam ca in cazul erorii *Not Filled*
I	Nu exista stabilitate cand are loc masurarea standardelor in	Bule in circuitul lichidelor. Defectiunea electrodului. Defectiune in	In timpul calibrarii: electrolitul nu poate fi masurat. In timpul	Incercam masurarea altor probe. Verificam obstructiile de la

	timpul calibrarii sau in timpul masurarii probelor	canalul de masurare.	masurarii probelor: rezultatele nu prezinta incredere.	nivelul tubulaturii si a electrozilor. Verificam tubulatura si pompa peristaltica. Schimbam electrodul sau contactam service-ul.
?	ADC in afara intervalului	Bule in circuitul lichidelor. Defectiunea electrodului. Defectiune in canalul de masurare.	In timpul calibrarii: electrolitul nu poate fi masurat. In timpul masurarii probelor: rezultatele nu prezinta incredere.	
S	Panta prea mare sau prea mica	Bule in circuitul lichidelor. Defectiunea electrodului. Defectiune in canalul de masurare.	Electrolitul nu poate fi masurat.	
!	Panta calibrarii este inversata.	Standardele sunt contaminate sau nu corespund.	Electrolitii nu pot fi masurati.	Verificam conectarea corecta a tubulaturii care vin de la standarde. Curatam si calibram. Inlocuim standardele.
Not filled	Proba nu a fost absorbita	Proba insuficienta. Proba cu coagul sau fibrina. Eroarea operatorului. Circuitul tubulaturii sau/si al electrozilor obstructionat. Tubulatura peristaltica	Operatiunea in curs nu este completa.	Verificam proba. Verificam procesul de absorbtie, daca este obstructionata tubulatura, tubul de absorbtie, pompa peristaltica si electrozii. Verificam

		defecta.		valvele.
Not Empty	Camera de masurare nu poate fi golita.	Circuitul tubulaturii sau al electrozilor este obstructionat. Tubulatura peristaltica defecta.	Operatiunea in curs nu este completa.	Inlocuim electrodul sau contactam service-ul.
Missing Pack	Nu recunoaste microcipul.	Microcipul nu este conectat.	Nu se calibreaza. Nu masoara. Nu se curata.	Conectam microcipul. Contactam service-ul.
Invalid Pack	Kitul nu corespunde echipamentului.	Tip de kit incompatibil cu echipamentul.	Nu se calibreaza. Nu masoara. Nu se curata.	Verificarea kitului. Contactarea service-ului.
Pack expired	Kitul a expirat.	Kit expirat sau data este gresit selectata.	Nu se calibreaza. Nu masoara. Nu se curata	Verificam data. Inlocuim kitul. Contactam service-ul.
Pack Empty	Kitul este terminat.	Electronic kitul este considerat terminat.	Nu se calibreaza. Nu masoara. Nu se curata	Inlocuim kitul. Contactam service-ul.
01	Eroare interna.	Hardware sau software.	Nu se calibreaza. Nu masoara.	Contactam service-ul.
02	Eroare interna.	Hardware sau software.	Nu se calibreaza. Nu masoara.	Contactarea service-ul.
C	Stabilizarea din timpul calibrarii intr-un punct difera de ultima calibrare in doua puncte.	Interferenta externa in timpul masurarii. Bule in circuitul lichidelor. Defectiunea electrodului. Defectiune in canalul de masurare.	Rezultatul nu este valid.	Repetam calibrarea sau masurarea. Verificam obstructionarea tubulaturii, electrozilor. Verificam valvele si tubulatura acestora.
L	Stabilizarea din timpul calibrarii intr-un punct difera de cea de			

	la ultima calibrare intr-un punct.	Impamantare proasta. Sursa de curent cu fluctuatii.		Inlocuim electrodul. Verificam posibilele interferente provenite de la celelalte echipamente. Contactam service-ul.
Q	Diferente mari in timpul procesului de masurare.			
u	Diferente mari in timpul calibrarii intr-un singur punct.			
U	Diferente mari in timpul stabilizarii probei.			

4.5.5 Atenţionări

Măsuri de protecţie a personalului

Toate produsele biologice şi kit-urile de reactivi din laborator sunt tratate ca şi cum ar fi potenţial infectate.

Toate eşantioanele de sânge sau de produse biologice sunt puse în containere sigure care previn scurgerea şi contaminarea feţei exterioare a containerelor.

Toate persoanele care manipulează probe de sânge sau produse biologice (chiar şi scoaterea dopului de la o eprubetă) poartă mănuşi pentru a evita posibilitatea contactului cu lichidul biologic. Mănuşile şi mâinile se spală după terminarea lucrării respective.

Suprafeţele de lucru din laborator sunt dezinfectate cu substanţe chimice adecvate după terminarea lucrului.

Materialele contaminate folosite în laborator sunt decontaminate înainte de a fi puse în saci sau containere în conformitate cu politica laboratorului referitoare la inactivarea materialului folosit.

Toate persoanele îşi spălă mâinile după terminarea activităţii în laborator şi îşi scot echipamentul de protecţie (halat, papuci) înainte de părăsirea laboratorului.

Toate produsele biologice şi kit-urile de reactivi din laborator sunt tratate ca şi cum ar fi potenţial infectate şi personalul respectă următoarelor reguli de bioprotecţie:

1. Suntem întotdeauna atenţi - intrare controlată
- atenţionarea riscului
- majoritatea bacteriilor manipulate în acest laborator sunt patogene pentru om

2. Purtăm echipamentul **de protecţie în spaţiile de lucru** :
- halat, mănuşi
- pe toată durata lucrului
- la ieşire echipamentul de protecţie îl abandonăm în spaţiul cu risc

3. Nu punem nimic în gură : - nu mâncăm, nu bem, nu fumăm, nu ne machiem în laborator

4. Nu punem obiecte personale pe masa de lucru :
- ochelari, mănuşi, poşete, batiste etc
- nu utilizăm lentile de contact în spaţiile considerate de risc

5. Materialele infecte
- le decontaminăm înainte de evacuare cu soluţii dezinfectante şi detergenţi
- le sterilizăm
- le evacuăm în containere dedicate

6. Decontaminăm suprafeţele de lucru :
- cu soluţii dezinfectante avizate şi detergenţi
- obligatoriu la încheierea lucrului

7. Evităm producerea de aerosoli

8.Ne spălăm pe mâini :
- cu apă şi săpun ori de câte ori este nevoie şi la sfârşitul programului de lucru

9. În caz de rănire accidentală: -anuţăm imediat şeful direct pentru acordarea de îngijiri calificate şi măsuri de urgenţă

10. Nu lucrăm cu leziuni cutanate neprotejate: - folosim comprese şi bandaje sterile impermeabile

4.5.7 CONTROLUL DE CALITATE

4.5.7.1 Controlul intern de calitate

Efectuăm controlul intern la începutul lucrului cu ser de control pe 2 nivele.

Analizorul reţine ultimele 22 de valori pentru care calculează media valorilor, deviaţia standard şi coeficientul de variaţie. Astfel, rezultatele controlului intern pot fi interpretate şi pot fi întreprinse eventuale acţiuni preventive şi corective. Rezultatele de control sunt arhivate în memoria aparatului şi sunt tipărite periodic.

Rezultatele QC sunt reprezentate grafic sub forma Diagramelor Levey Jeninngs care se interpreteaza conform procedurii PG 5.6.

4.5.7.2 Controlul extern de calitate

Laboratorul Spitalului Clinic de Boli Infectioase „Sf. Parascheva" Iasi participă la comparări interlaboratoare, în principal la programe de evaluare externă a calităţii internationale. Rezultatele testării unor probe oarbe sunt trimise organizatorilor acestor programe care le interpretează statistic şi le prezintă atât sub formă numerică, cât şi sub formă grafică.

Sunt prezentate valorile următoarelor mărimilor statistice: media rezultatelor măsurărilor efectuate pe aceeaşi probă, deviaţia standard a acestor rezultate şi coeficientul lor de variaţie.

Rezultatele laboratorului sunt comparate cu cele ale unor grupuri de comparaţie (grupul laboratoarelor cu aceeaşi metodă de determinare, grupul tuturor laboratoarelor participante etc.)

Rezultatele comparărilor interlaboratoare sunt analizate de către Şeful de departament şi Managerul tehnic şi în cazul identificării unor neconformităţi, se iniţiază PG 5.9 – Identificarea şi controlul neconformităţilor.

4.5.8 PROCESAREA REZULTATELOR

Înregistrarea probelor se face la recepţie conform regulilor procedurii generale PG 5.4 – Proceduri preanalitice.

Calculul rezultatelor se face automat de către analizorul Diestro 103 AP care foloseste metoda ISE directa.

4.5.9. RAPORTARE

Executăm raportarea rezultatelor conform PG 5.8, in softul medical, generindu-se automat buletinul de analiza

Rezultatele critice sunt înregistrate in Registrul de anunturi, cod RGL 4.7-01

TABEL CU VALORI DE REFERINŢĂ

Electrolit	Unitate de masura	Interval de referinta pentru ser
Sodiu	mmol/l	135 - 148
Potasiu	mmol/l	3.7 - 5.3
Clor	mmol/l	98 - 109
Calciu	mg/dl	4 - 5.6

TABEL CU VALORI DE ALERTĂ (CRITICE)

Electrolit	Unitate de masura	Valori critice scazute	Valori critice scazute
Sodiu	mmol/l	120	158
Potasiu	mmol/l	2.8	6.2
Clor	mmol/l	75	156
Calciu	mg/dl	3	6.4

5. RESPONSABILITĂŢI

5.1 MANAGERUL TEHNIC

- Stabileşte împreună cu şeful de departament programul de control extern.
- Verifică şi aprobă Buletinul de analiză.
- Asigură consultanţă privind rezultatele analizelor atunci când beneficiarul o cere.

Notă : Pentru cazul în care este absent, este substituit de locţiitorul său.

5.2 ŞEFUL DE DEPARTAMENT

- Stabileşte programul de control intern şi extern.
- Verifică şi validează rezultatele controlului intern de calitate.
- Execută analizele pentru care este responsabil şi validează prin semnatură rezultatele.
- Verifică şi validează rezultatele obţinute de către personalul din subordine.

5.3 RESPONSABILUL DE ANALIZĂ

- Recepţionează produsele biologice de analizat
- Execută analizele pentru care este responsabil şi validează prin semnatură rezultatele acestora, pe Buletinul de analize.
- Înscrie rezultatele analizelor de pe hârtia imprimantă in softul medical
- Validează rezultatele in softul medical.

5.4 INFIRMIERA

- Execută şi întreţine curăţenia în laborator.
- Colectează şi depozitează reziduurile de probe şi deşeurile auxiliare, conform instrucţiunilor.

6. ÎNREGISTRĂRI ŞI ANEXE

- Rezultatele printate de catre echipament
- Rezultatele printate ale controlului intern de calitate
- Caiet de lucru, cod RSL-B5-03-01

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICĂ

HEMOLEUCOGRAMA AUTOMATĂ

COD: PSL-H04-01

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Responsabil Calitate
Lorena Zaborila

Elaborat:
Dr. Denisa Covaciuc

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Hematologie	2		Dr. Denisa Covaciuc					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1.SCOP ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

2. DOMENIUL DE APLICARE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

4.1. DEFINITII ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.2. ABREVIERI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5. DESCRIEREA ACTIVITATII ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5.1. CONTROLUL DOCUMENTELOR INTERNE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.1.2. CODIFICAREA DOCUMENTELOR ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.1.3. ELABORAREA DOCUMENTELOR SISTEMULUI CALITATII LABORATORULUI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.1.4. ANALIZAREA SI APROBAREA DOCUMENTELOR SISTEMULUI DE MANAGEMENT AL CALITATII LABORATORULUI. ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.1.5. EDITARE, DIFUZARE, RETRAGERE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.1.6. MODIFICAREA DOCUMENTELOR ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.1.7. PAGINAREA DOCUMENTELOR ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.1.8. EDITAREA INFORMATIZATA A TEXTULUI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5.2. CONTROLUL DOCUMENTELOR EXTERNE ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5.3. ARHIVAREA SI GESTIONAREA DOCUMENTELOR SISTEMULUI DE MANAGEMENT AL CALITATII ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5.4. ELIMINAREA DOCUMENTELOR ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

6. RESPONSABILITATI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

7. INREGISTRARI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

8. ANEXE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

1. SCOP ŞI DOMENIU DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul compartimentului de hematologie, 04 din Laborator, în vederea determinării a 24 parametrii ai hemoleucogramei automate.
Analizorul foloseşte sânge integral, venos sau capilar, recoltat pe K_3 EDTA permiţând prin rezultatele furnizate, elaborarea unui diagnostic clinic pozitiv, diferenţial cât şi evaluarea evoluţiei în dinamică, sub terapie, a bolnavilor investigaţi. Proba de sânge recoltată în punctele de recoltare stabilite, este preluată, verificată, numerotată în registrul laboratorului. Este transmisă apoi pentru analiză în compartimentul de hematologie.

2. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ

2.1. SR EN ISO 15189: 2007-Laboratoare medicale.Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă .
2.2. SR EN ISO/TR 22869-Laboratoare medicale.Ghidul pentru implementare în laboratoare a ISO 15189:2003
2.3. SR EN 15190:2005-Laboratoare medicale.Cerinţe pentru securitare.
2.4. Manualul calităţii Laboratorului cod MC-01, Ed.1, Rev.0
2.5. Manualul de operare al analizorului Sysmex XS-1000i elaborat de Sysmex Corporation, Kobe, Japan 2005
2.6. Păun, R., , Tratat de medicină internă Hematologie ’’, Ed.Medicală, Bucureşti 1997
2.7. Manole, G.H., , Analize de laborator” Ed.Coresi 2004
2.8. Kondi, V., , Laborator clinic-Hematologie’’ Ed. Medicala 1981
2.9. Prospect sânge de control
2.10. Manualul de recoltare a probelor biologice MRP 01
2.11. Norme de curatenie, dezinfectie si eliminarea deseurilor infectioase, cod POL-01
2.12. Balcells, Al., , Examens de laboratoire pour le practicien’’ 1998 Masson, Paris

3. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI

3.1. DEFINŢII

3.1.1. Hemoleucogramă automată - o baterie de teste hematologice compusă din doua seturi de bază: numărătoarea completă a celulelor din sânge şi numărătoarea diferenţiată a leucocitelor.

3.1.2. Reproductibilitatea se bazează pe măsurători din aceeaşi probă de sânge integral, proaspăt, fără alarme.
3.1.3. Calibrare - set de operaţii care stabileşte în condiţii specificate relaţia dintre valorile indicate de instrumentul de măsurare şi valorile corespunzătoare concentraţiei unui analit.
3.1.4. Conformitate - îndeplinirea de către un produs, proces sau serviciu a unor cerinţe specificate.
3.1.5. Control intern de calitate- tehnici şi activităţi operaţionale din cadrul unui laborator care sunt folosite pentru a îndeplini cerinţele calităţii.
Monitorizează procesul de verificare a siguranţei măsurătorilor şi cel de eliminare a neconformităţilor.
3.1.6. Evaluarea externă a calităţii - determinarea performanţei măsurătorilor efectuate în laborator cu ajutorul comparării inter-laboratoare.
3.1.7. Analiză de laborator - determinarea uneia sau mai multor caracteristici ale unei probe în conformitate cu o procedură.
3.1.8. Metoda de referinţă - o metodă descrisă tehnic clar şi exact pentru un analit care şi-a dovedit suficientă acurateţe şi precizie în determinările de laborator şi care poate fi folosită pentru a evalua validitatea altor metode de măsurare şi caracterizarea materialelor de referinţă.
3.1.9.Acurateţea - apropierea dintre rezultatul unui test şi valoarea de referinţă acceptată.
3.1.10.Limita de detecţie - rezultat singular minim care cu o anumită probabilitate poate fi diferenţiat de valoarea blancului.
3.1.11. Linearitate - interval de concentraţie în care intensitatea semnalului obţinut este direct proporţional cu concentraţia substanţei care a produs semnalul.
3.1.12.Precizie - apropierea dintre rezultatele independente ale măsurătorilor obţinute în condiţii specificate.
3.1.13.Proba - unul sau mai multe eşantioane luate dintr-un sistem şi destinate obţinerii de informaţii cu privire la întregul sistem.
3.1.14. Probă de laborator - probă primară sau subprobă preparată pentru a fi trimisă/primită în laborator pentru a fi măsurată.
3.1.15.Test - operaţiune tehnică constând în determinarea uneia sau mai multor caracteristici ale unui produs, proces, serviciu în concordanţă cu o anumită procedură.
3.1.16.Validare - confirmare, prin examinarea şi prezentarea dovezilor obiective a faptului că sunt îndeplinite cerinţele particulare ale une utilizari specifice propuse.
3.1.17.Trasabilitate - o proprietate atribuită unui rezultat, test sau valoare măsurată care poate fi raportată la o referinţă fixată, de obicei standarde naţionale sau internaţionale, printr-o serie continuă de determinări ale cărei incertitudini sunt cunoscute.
3.1.18.Incertitudine de măsurare - estimaţie caracterizând intervalul de valori în interiorul căruia se găseşte valoarea adevărată a măsurandului.

3.1.19.Limitele intervalului de valori - interval care cu o anumită probabilitate include valoarea adevarată a măsurandului .

3.2. ABREVIERI

HLG - hemoleucograma
WBC - (white blood cells) –leucocite
RBC – (red blood cells) – eritrocite/hematii
HGB – hemoglobină

HCT – hematocrit
MCV - (medium cell volume)-volum eritrocitar mediu/VEM
MCH - (medium cell hemoglobin)-hemoglobină eritrocitară medie/HEM
MCHC - (medium cell hemoglobin concentration)-concentraţie în HGB eritrocitară medie/CHEM
PLT – platelet-plachete/trombocite
MPV - volum plachetar mediu
P-LCR – (platelet large cell ratio)-proporţia de macroplachete din totalul de plachete
PCT - plachetocrit
NEUT - neutrofile
EO - eosinofile
MONO - monocite
BASO - bazofile
LYMPH - limfocite
RDW (red cell distribution width)- variaţia distribuţiei eritrocitelor
PDW (platelet distribution width)- variaţia distribuţiei plachetelor
FL –formulă leucocitară
Fe - fier

4. DESCRIEREA PROCEDURII
SEMNIFICAŢIE CLINICO-BIOLOGICĂ

Hemoleucograma reuneste infomatia prvitoare la populatiile de eritrocite, leucocite trombocite oferita de un analizor automat.
Prin măsurarea de elemente celulare din sângele periferic se obţin date importante într-un timp foarte scurt despre numărul, tipul, dimensiunea şi forma celulelor. Deşi în majoritatea cazurilor aceste măsurători sunt exacte pot exista şi situaţii (limite de sistem) în care valorile redate să înregistreze anomalii.
În astfel de cazuri se execută frotiul de sânge periferic şi se examinează la microscopul optic pentru aprecieri semicantitative, detalii morfologice, de tinctorialitate precum şi detecţia de celule anormale.

PRINCIPIUL METODEI

4.1.1. Analizorul Sysmex XS- 1000i
Este un analizor automat de hematologie dotat cu tehnologie 5Diff destinat laboratoarelor clinice. Analizează şi afişează rezultatele pentru 24 de parametri hematologici ai probei de sânge venos sau capilar.
În funcţie de modalităţile de determinare aceştia se împart în :
a) parametri măsuraţi direct:
-HGB – prin metoda spectrofotometrică fără cianuri – SLS -
-WBC, RBC, PLT – prin metoda impedanţei
-MCV, MPV – prin calcul (suma volumelor celulelor/numar total de celule)
-RDW, PDW – prin aprecierea coeficientului de variaţie al marimii eritrocitelor respectiv plachetelor.
b) parametri măsuraţi indirect:

-HCT =RBC × MCV/10
-MCH =HGB × 10/RBC
-MCHC = HGB × 100/HCT
c)parametri evaluaţi prin măsurarea dimensiunilor, densităţii optice, a refracţiei şi absorbţiei :
LYMPH: 35-90 fl; EO, MONO, BASO- 90-160 fl; NEUT >160 fl

4.1.2. Principiile detecţiei

Acest instrument efectueaza analize hematologice conform cu focusarea hidrodinamică (impedanţa), metoda citometriei în flux (utilizand un laser cu semiconductor) şi metoda SLS -hemoglobină.
a) Metoda focusării hidrodinamice (impedanţa)
În interiorul detectorului, ’’sample nozzle’’ este poziţionat în faţa aperturii în poziţie centrală. Proba diluată este trimisă forţat în camera conică, înconjurată de o teaca frontală de reactiv şi dirijată către centrul aperturii, traversând-o apoi la tubul de fixare. Deoarece celulele sanguine trec linear prin apertură se previne generarea de ” pulsuri’’ false de către acestea. Se îmbunătăţeşte astfel acurateţea şi reproductibilitatea numărătorii celulelor.
b) Metoda citometriei în flux cu laser semiconductor
Citometria este folosită pentru a analiza caracteristicile fiziologice şi chimice ale celulelor. O probă de sânge este aspirată, măsurată şi diluată într-un raport specific şi colorată.Proba este trimisă în celula de flux.O rază laser este emisă către celulele sanguine şi trece prin celula de flux.Lumina refractată în faţă şi lateral este captată de o fotodiodă şi lumina fuorescentă laterală este captată de un tub fotomultiplicator şi convertită în ’’pulsuri ’’ electice aducând informaţii despre celulele sanguine.
c) Metoda cu SLS - hemoglobină
Metoda îmbină avantajele a două metode anterioare: cu cianmethemoglobină şi oxihemoglobină.Viteza de conversie a HGB este mare şi nu foloseşte substanţe toxice

fiind adecvată sistemelor automate de determinare. Membrana eritrocitelor este lizată de surfactanţi cu eliberare de HGB.Globina din structura HGB este modificată prin acţiunea grupării alchilhidrofile a SLS ducând la conversia HGB din stare feroasă (Fe^{2+}) în stare ferică (Fe^{3+}) cu formarea methemoglobinei care se combină cu SLS şi formează SLS – HGB .

4.2. RESURSE NECESARE

4.2.1. Echipamente şi accesorii. Descriere şi funcţii .

Vedere de ansamblu asupra aparatului.
Analizorul Sysmex XS-1000i are în configuraţie următoarele componente principale:
-Unitatea principală XS-1000i ce analizează probele şi controalele.

-Unitatea de procesare a informaţiei (I.P.U.): procesează datele generate de echipamentul de măsură.
-Imprimanta de pagini.
-Dispozitiv pentru încărcarea automată a probelor : dirijează automat probele către unitatea principală (alimentator de probe).

4.2.2. Intervale de referinţă .

Intervalele de referinţă pentru populaţia normală au fost stabilite pe baza unor probe recoltate de la subiecţi normali.
Intervalele pentru fiecare parametru este calculat folosind un interval de încredere 95 % .

Parametru	Interval pentru femei	Interval pentru bărbaţi	Unitate
WBC	3, 98-10, 04	4, 23-9, 07	×10³/µl
NEUT	34, 0-71, 1	34, 0-67, 9	%
LYMPH	19, 3-53, 5	21, 8-57, 0	%
MONO	4, 7-12, 5	5, 3-12, 2	%

Parametru	Interval pentru femei	Interval pentru bărbaţi	Unitate
EO	0, 7-4, 0	0, 8-4, 0	%
BASO	0, 1-1, 2	0, 2-1, 2	%
NEUT	1, 56-6, 13	1, 78-5, 38	×10³µl
LYMPH	1, 18-3, 74	1, 32-3, 57	×10³µl
MONO	0, 24-0, 36	0, 30-0, 82	×10³µl

EO	0, 04-0, 36	0, 04-0, 54	×10³µl
BASO	0, 01-0, 08	0, 01-0, 08	×10³µl
RBC	3, 93-5, 22	4, 63-6, 08	×10⁶µl
HGB	11, 2-15, 7	13, 7-17, 5	g/dl
HCT	34, 1-44, 9	40, 1-51, 0	%
MCV	79, 4-94, 8	79, 0-92, 0	fl
MCH	25, 6-32, 2	25, 7-32, 2	pg
MCHC	32, 2-35, 5	32, 3-36, 5	g/dl
RDW-CV	11, 7-14, 4	11, 6-14, 4	%
RDW-SD	36, 4-46, 3	35, 1-43, 9	fl
PLT	182-369	163-337	×10³µl

Valori normale ale E, HGB, HCT la diverse vârste

Vârstă	E ×10⁶µl	HGB g /dl	HCT %
1-5 zile	5, 1 ± 1, 0	17, 3 ± 4.0	49, 0 ± 10
16 zile-6 luni	4, 5 ± 0, 7	12, 2 ± 2, 3	36, 0 ± 6, 0
6 luni-12 luni	4, 6 ± 0, 7	11, 8 ± 2, 3	35, 0 ± 5, 0
1 an-3 ani	4, 5	12, 5	36
4 ani-10 ani	4, 7	12, 9	38
11 ani-15 ani	4, 8	13, 4	39

Formula leucocitară şi numărul de leucocite în funcţie de vârstă după J. Bernard

Nr. Leucocite × 10^3/µl	Nou-născut	9 luni	3 ani	10 ani	Adult
	10-20	4-12	4-10	5-10	5-10
NEUT %	60-70	25-40	30-35	45-60	50-70
EO %	1-2	1-4	1-4	1-4	1-4
BASO %	0, 4	0, 2	0, 1	0, 1	0, 1
LYMPH %	20-25	50-70	45-60	40-50	30-45
MONO	12	8	6	6	6
MIELOCITE	0, 5	0	0	0	0

4.2.3. REACTIVI ŞI MATERIALE DE REFERINŢĂ

Achiziţionarea şi recepţia reactivilor şi materialelor de referinţă se fac conform procedurii generale PGL-4.6 ,’’Aprovizionare’’. Responsabilul de analiză verifică îndeplinirea specificaţiilor tehnice şi termenele de valabilitate, apoi asistentul de laborator desemnat cu evidenta gestiunii laboratorului completeaza fisele de magazie respective.

Reactivii utilizati pentru analizorul Sysmex XS-1000i .
a) Cellpack : diluent pentru analizoare hematologice. Se utilizează până la data expirării înscrisă pe cutie sau după deschidere 60 de zile la temperatura +5- 30°C .
Ingrediente active: Clorură de sodiu 0, 64 %
Acid boric 0, 10 %
Tetraborat de sodiu 0, 02 %
EDTA 2 K 0, 002
Condiţionat în bidoane de 20l.

b) Stromatolyser -4DL : diluent pentru analizoarele de hematologie Sysmex
Ingrediente active: Surfactant nonionic 0, 018
Sare organică cuaternară de amoniu 0, 08 %
Condiţionat în flacoane de 2 l.
c) Stromatolyser -4DS– se utilizează pentru colorarea leucocitelor din probele diluate şi lizate în prealabil. Serveşte la determinarea numărătorii 5 Diff (Lymph, MONO, NEUT, EO, BASO)
Ingrediente active: Polimethine dye 0, 002
Metanol 3, 00%
Etilenglicol 96.90 %
Condiţionat în plicuri de 42 ml .
d) Sulfolyser: reactiv fără cianuri utilizat pentru măsurarea HGB.
Realizează lizarea eritrocitelor şi acţionează asupra globinei pentru a forma un hemocrom stabil.

Ingrediente : Sodiu lauril sulfat 0, 17 %
Condiţionat în flacoane brune de 500 ml .

4.2.4. RESURSE UMANE

-medic primar laborator clinic şi microbiologie
-asistent principal laborator clinic

Măsuri de protecţie a personalului
Toate produsele biologice sunt tratate ca şi cum ar fi potenţial infectate şi manipulate cu respectarea următoarelor reguli de bioprotecţie:
-intrarea controlată: majoritatea bacteriilor manipulate în acest laborator sunt patogene pentru om.
-purtarea echipamentului de protecţie în spaţiul de lucru (halat, manuşi pe durata lucrului) La ieşire echipamentul se abandonează în spaţiul de risc.
-nu se pune nimic în gură; este interzis a bea, mânca, fuma.
-nu se pun obiecte personale pe masa de lucru.
-decontaminarea suprafeţelor de lucru cu soluţii dezinfectante avizate este obligatorie la încheierea lucrului.
-se vor citi cu multă atenţie informaţiile referitoare la reactivii toxici sau cu risc biologic specificate în prospectul de lucru al reactivului.
-a se spăla cu apă şi săpun ori de căte ori este nevoie şi la sfărşitul programului de lucru.
Nu se lucrează cu leziuni cutanate neprotejate : se folosesc comprese şi bandaje sterile impermeabile.

4.2.5. CONDIŢII DE LUCRU

Analizoarele Sysmex au fost proiectate pentru a produce radiaţii electromagnetice sub limita admisibilă.
Interferenţele electromagnetice cu analizoarele sunt limitate la nivelul funcţionării corecte a altor instrumente, în conformitate cu destinaţia lor .
Temperatură şi umiditate: analizoarele Sysmex pot funcţiona între 18-32 °C cu o umiditate relativa de maxim 85 % fără condens.

4.3.1. Produsul biologic analizat

Probele de sânge sunt recoltate conform Manualului de recoltare MRP 01, prin puncţie venoasă sau capilară, pe vacutainere de 2 ml cu dop mov cu anticoagulant K_3 EDTA, respectiv microtainere K_3 EDTA cu tubi capilari, după completarea formularelor de solicitare analize medicale .
Specimenele pot fi păstrate la temperatura camerii 6-8 ore şi 24 ore la frigider fără să se modifice numărul de eritrocite, leucocite, trombocite cât şi valoarea HGB.

4.3.2. Condiţii de utilizare

Se utilizează numai sânge uman sau artificial de control.
Orice altă utilizare este considerată nonspecifică.

Se permit pentru utilizare numai reactivii şi soluţiile menţionate în manualul de instrucţiuni de folosire emis de firma producătoare Sysmex .

4.4. Descrierea activitaţii
4.4.1. Operaţiuni pregătitoare.
Recepţionarea probelor biologice are loc în intervalul 8-12 şi în timpul contravizitei 16.30-18.30 (pentru analize medicale de urgenţă :8-15, 16-20).Vacutainerele cu dop mov recoltate în punctele de recoltare (pavilioanele Spitalului) sunt transportate la Laborator în poziţie verticală, însoţite de formularul de solicitare analize, cod F-PGL 5.4-1 L .

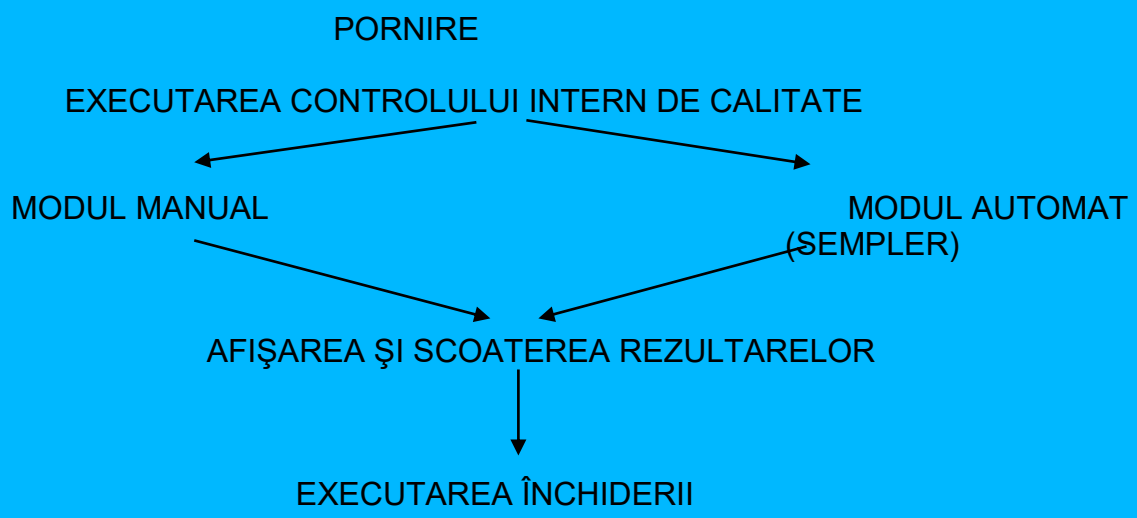
Precauţii standard: toate probele de sânge sunt considerate potenţial infecţioase şi manevrate în consecinţă în conformitate cu legislaţia în vigoare naţională şi internaţională.
Verificarea cantitativă şi calitativă a probelor de sânge şi înregistrarea solicitărilor în registrele de evidenţă a comenzilor(interne, externe, respinse) se fac conform procedurii generale PGL 4.4 , , Analiza contractelor''.

Criterii pentru respingerea unei probe de sânge:
-identificare necorespunzătoare a vacutainerului
-volum de sânge inadecvat
-prezenţa de coaguli în probă sau coagulată complet
-transport sau stocare necorespunzătoare
Atunci când proba nu corespunde cantitativ sau calitativ, persoana responsabilă cu verificarea şi înregistrarea probelor de la camera de receptură anunţă telefonic asistentul medical de necesitatea repetării recoltării.
Probele de sânge care întrunesc criteriile de acceptare, inscripţionate cu ID-ul unic şi formularele de solicitare respective sunt preluate de asistenta de laborator din camera de receptură, transferate în compartimentul de hematologie şi înregistrate în registrul de lucru pentru hemoleucograme, cod RGL 4.4-01-L.
Verificările înaintea pornirii analizorului sunt efectuate de medicul responsabil de analiză şi constau în :
-a) verificarea reactivilor : instrumentul se opreşte automat când un reactiv se
termină în timpul lucrului, se înlocuieşte acest reactiv, se porneşte lucrul.
Date orientative pentru numărul de probe ce pot fi analizate/container de reactiv şi volume/probă consumate.
Cellpack -20 l –aprox. 570 probe; aprox 36 ml/probă
Stromatolyser -4DL -2 l – aprox. 1000 probe; aprox.2 ml/probă
Stromatolyster -4DS -42 ml- aprox.1000 probe; aprox. 0, 03 ml/probă
Sulfoliser -500ml –aprox.1000 probe; aprox. 0, 5ml/probă
-b) verificarea instrumentului: se verifică conexiunile tuburilor şi cablurilor;
Dacă tubulatura nu este îndoită, înnodată, dacă este conectat la reţeaua electrică.
-c) verificarea containerului de deşeuri lichide şi golirea acestuia la nevoie.
-d) verificarea hârtiei din imprimantă şi completarea corespunzatoare

4.4.2. Vedere de ansamblu a operării

Analizorul hematologic Sysmex XS-1000i cuprinde o I.P.U.(unitate de procesare a informaţiei)pentru procesarea datelor, o unitate centrală pentru măsurători şi o imprimantă.

Responsabilul de analiză porneşte în ordine imprimanta, I.P.U., unitatea centrală.După pornire se urmează secvenţa operaţiilor de mai jos pentru efectuarea controlului intern de calitate, analizelor, scoaterea rezultatelor şi apoi oprirea alimentării .



4.4.3. VEDERE DE ANSAMBLU A ECRANELOR

a) Titlul. Afişează nivelul din meniu.
b) Bara de meniu. Pentru fiecare meniu există submeniuri.
La apăsarea butonului stânga a mouse-lui poziţionat pe denumirea unui meniu se afişează desfăşurat lista de submeniuri.
c) Bara de unelte. Butoanele situate imediat sub bara de meniu sunt unelte.
Itemurile comune tuturor ecranelor sunt alocate butoanelor F_1 - F_8 .
d)Tab.Tab-urile pot fi afişate întro fereastră .Pot fi selectate pentru a schimba conţinutul afişat întro fereastră.
e) Zona de ferestre. Arie pentru efectuarea proceselor şi operaţiunilor de bază.
f) Casetele de dialog. Acestea pot fi afişate în cadrul unei ferestre active pentru a-l consulta pe utilizator pentru o decizie sau o confirmare.
g) Bara de afişare a stării sistemului.
Bară afişată în subsolul ariei de ferestre. Afişează starea unităţii centrale, numărul probei, tipul analizei.

4.4.4. Descrierea activităţii de efectuare a HLG automate pe analizorul Sysmex XS-1000i .

Prin deschiderea unităţii centrale se efectuează următoarele operaţiuni: autotest, descărcarea programului de control al unităţii principale, iniţializarea părţilor mecanice şi hidraulice, secvenţa de spălare, stabilizarea temperaturii, verificarea pe gol (background check).
Lucrul începe după ce temperatura internă a aparatului atinge valoarea necesară.Temperaturile camerei de reacţie şi încălzitorului de reactiv sunt afişate în caseta de

dialog, , Temperature monitoring’’când temperatura s-a stabilizat caseta se închide automat.

Programul începe cu efectuarea controlului intern de calitate cu sânge de control pe 3 nivele de valori L_1, L_2, L_3 livrat de firma producătoare.
Se scoate din frigider, se aduce la temperatura camerei, se omogenizează prin mişcări de rotaţie şi răsturnare.
Se selectează în meniul aparatului, , Q C ’’program. Se deschide lista fişierului, , Q C File ’’.
Se selectează cu click stânga nivelul analizat; se selectează, , Modul manual ’’.
Se deschide flaconul, se poziţionează în tubul adaptor. Se dă click, , OK’’ şi se apasă butonul, , START’’.
Rezultatele se vor afişa automat în caseta de dialog. Dacă nu există nici o atenţionare (alarmă) se dă click, , ACCEPT ’’şi rezultatele se vor înregistra în harta, , Q C ’’. Se procedează similar pentru cele 3 nivele.
Controlul calitaţii asigură corectitudinea datelor comunicate.
Permite monitorizarea pe termen lung a stabilităţii valorilor analizate.
Poate să identifice precoce diferite probleme şi să le prevină. Controlul calităţii se execută înainte de analizarea probelor, cel puţin o dată la 8 ore de lucru, după operaţii de întreţinere, după înlocuirea unui reactiv, când precizia datelor analizate este îndoielnică.

Analizarea probelor se poare realiza în modul manual şi automat.

Analiza în modul manual .
Analiza se poate efectua când unitatea centrală este gata (spot verde), capacul este ridicat.
Cu mouse-ul se selectează pictograma, , Manual mode’’ din ecranul, , Controller’’; dublu click pentru a lansa ecranul, , Manual mode ’’.
Ecranul poate fi lansat şi cu butonul, , Manual ’’ din bara de unelte sau tasta F_2 .
Se înregistrează datele de identificare ale pacientului pe câmpurile afişate: numărul probei din registrul de evidenţă primară, nume, prenume pacient, pavilion, numărul foii de observaţie.
Proba se agită, se deschide, se pozitionează în tubul adaptor potrivit.
Se urmăreşte led-ul situat în bara de jos a ecranului să fie gata de aspirare, se dă click, , OK’’ şi se apasă butonul, , START ’’ .
După analizare rezultatele se imprimă, proba se închide şi se păstrează 24 ore la frigider.

Analiza în modul automat(sempler) .
În acest mod de lucru agitarea, aspirarea, analiza probei sunt efectuate automat.
Capacul sempler-lui este închis.
Dacă acesta este deschis se activează întrerupătorul de analiză şi programul se întrerupe printr-o avertizare sonoră şi un mesaj scriptic.
Se verifică cu atenţie starea etichetelor de pe vacutainere să nu fie încreţite, multiple, exfoliate pentru ca vacutainerele să fie uşor ridicate şi aduse înapoi în rack. Se lucrează 20 de probe instalate în rack .

Se selectează din bara de unelte, , Work list ’’ apoi, , Register ’’pentru înregistrarea datelor pacienţilor conform câmpurilor afişate : numărul probei din registrul de evidenţă primară, numărul rack, numărul tubului, tipul de analiză, , , CBS+Diff ’’, numărul foii de observaţie, nume, prenume pacient, vârsta, mediul de provenienţă, sex, pavilion.
După fiecare pacient se dă click, , ADD NEXT ’’şi la ultimul, , OK’’asigurându-se succesiunea înregistrării.
Se instalează vacutainerele în rack, se verifică corectitudinea ordinii de la 1 -10 a rack 1 şi rack 2 .
Se aşează rackii în sempler. Se închide capacul.
Se selectează din bara de unelte, , sempler ’’, apare un nou ecran în care se înscrie numărul de ordine al primei probe, se confirmă şi numărul rack-ului, numărul probei se dă, , OK’’ şi se apasă butonul, , START’’ plasat pe sempler.
Rezultatul analizelor vor fi imprimate succesiv pe parcursul a aproximativ 20 minute.
Un semnal sonor avertizează finalul analizelor; în caseta de dialog afişată se dă click pe, , OK’’.
Vacutainerele se păstrează la frigider 24 ore.

4.4.5. Închiderea analizorului.

Când este efectuată închiderea, linia de diluţie şi detectorul sunt curate.
Se trece instrumentul printrun ciclu de închidere la sfârşitul fiecărei zile de lucru .
Procedura de închidere a analizorului este :
- se apasă butonul, , Controller’’ din ecranul meniu, sau dublu click pe pictograma, , Shut Down ’’, se deschide caseta de dialog, , Shut Down ’’.
- se confirmă, , Execute’’urmând un ciclu de spălări de 2 minute.
- se închide butonul analizorului.
- se inchide I.P.U.
- se apasă butonul, , Start’’ din bara de jos a ecranului, se selectează, , Shut Down’’ din caseta de dialog realizându-se operaţiunea de închidere a programului.
-se închide imprimanta.

4.5. Calibrarea

Acest proces se efectuează pentru a compensa orice inadvertenţă apărută în sistem. Analizorul Sysmex XS-1000i îşi determină automat valoarea de calibrare prin programul de deschidere zilnică. Calibrarea iniţială este realizată de reprezentantul de service autorizat de la firma furnizoare a aparatului.
Orice eroare semnalată de controalele interne sau externe este anunţată inginerului de service autorizat care va acţiona specific.

4.6. Curăţare.Întreţinere.

Acest instrument necesită întreţinere regulată pentru a-şi păstra cea mai bună condiţie. Desfăşurarea acestei activităţi se înregistrează în fişa de înregistrare a mentenanţei .
Întreţinerea zilnică : se realizează prin procesul de deschidere/închidere.
Întreţinerea lunară: se realizează prin spălare cu soluţie Cellclean livrată în flacoane de 10 ml pe baza referatului de necesitate.

-se repartizează 3 ml soluţie întrun vacutainer.
-se lucrează în modul manual urmărind indicaţiile căsuţei de dialog pe parcursul a 15 minute.
Întreţinere la nevoie: se înlocuieşte containerul de deşeuri lichide, se execută clătirea automată, curăţarea camerei de deşeuri, eliminarea bulelor din celula de flux, golirea camerei de reacţie, eliminarea cheagurilor din detectorul RBC, curăţarea aperturii detectorului RBC .
Înlocuirea consumabilelor : se execută de responsabilul de analiză.
Înlocuirea acului de aspirare, a siguranţelor, a pompei de aer sunt operaţii ce aparţin reprezentantului firmei de service.
Înlocuirea reactivilor este executată de operator :
- instrumentul se opreşte automat după ce ultima analiză este completă.
- se deschide caseta de dialog, , Help ’’.
- se înlocuieşte reactivul indicat cu unul nou înserând parametrii în câmpurile casetei de dialog, , Reagents replecement ’’(volum, numărul lotului, data expirării).
- se dă click pe butonul, , Execute ’’.
Această secvenţă de înlocuire este comună tuturor reactivilor specifici instrumentului.

4.7. Controlul intern de calitate.
Calitatea rezultatelor obţinute în laboratorul de analize medicale-compartimentul hematologie- depinde de mai mulţi factori :

a) Metoda analitică potrivită ca specificitate clinică, acurateţe, limită de detecţie, interval analitic. Producătorii analizorului Sysmex XS-1000i asigură, prin recunoaşterea în domeniu a performanţelor tehnologice a acestui echipament, valoarea diagnostică şi precizia celor 24 de parametri hematologici comunicaţi.
b) Reactivii utilizaţi sunt specifici acestui tip de analizor, sunt gata pregătiţi astfel nu mai intervine factorul uman în preparare, au stabilitate specificată în prospectul de folosire. Au certificat de calitate şi sunt stabili în flacoane închise şi deschise.
c) Sângele de control intern posedă certificat de calitate asigurând trasabilitatea măsurătorilor.

Laboratorul face dovada efectuării acestui control pe trei nivele L_1, L_2, L_3 în condiţiile menţionate anterior, prin dosarul de control intern al analizorului Symex împreună cu hărţile de control .

Dosarul cu informaţii al analizorului cuprinde copii xerox după toate fişele de service(operaţiuni de mentenanţă, reparaţii, verificări).

d) Compartimentul de hematologie este înscris cu hemoleucograma automată executată pe Sysmex XS-1000i la un program de supraveghere internaţională a calităţii.
Sunt urmăriţi următorii parametrii: HGB, HT, RBC, WBC, MCV, MCH, MCHC, PLT.

Rezultatele proprii Laboratorului au fost comparabile cu cele ale mediei, încadrându-se în limitele de variaţie admise. Acestea sunt incluse în dosarul de control extern .

e) Analizorul Sysmex XS -1000i furnizează pe lângă valorile numerice ale diferitelor celule, indici şi constante eritrocitare, variaţiile de distribuţie celulară şi HISTOGRAME pentru eritrocite, leucocite, plachete.

Ele conţin informaţii utile operatorului privind controlul calităţii rezultatelor elaborate şi promovarea investigaţiilor ulterioare (citologia frotiului sanguin, reticulocite, citochimie).

4.8. VALOAREA CLINICĂ A HLG AUTOMATE

Întrucât metodele manuale, tradiţionale de numărate a celulelor sanguine sunt într-o oarecare măsură imprecise, necesită timp şi muncă intensivă, dezvoltarea liniilor de cercetare şi producţie a analizorilor hematologici automaţi a devenit o necesitate imperioasă.
Aceste instrumente moderne realizează măsurători pe un număr foarte mare de celule (10.000 fată de 100-200 în metodele clasice) furnizând rezultate statistic semnificative, cu înalt nivel de exactitate.
Analizorul Sysmex XS-1000i este un echipament de ultimă generaţie, performant, beneficiind de progresul tehnologic actual, oferind clinicianului informaţii multiple şi sigure cu condiţia ca probele să fie corect recoltate, validate, procesate, analizorul să fie bine întreţinut, operatorii instruiţi şi martorii de calitate corespunzători.

4.9. ACTIVITĂŢI FINALE

Rezultatele imprimate sunt analizate de responsabilul de analiză, parafate, codificate, triate pentru eventualele investigaţii ulterioare.

4.10. REZULTATE ŞI INTERPRETARE

Parametru	Valori de panică	
	Joase	Înalte
Nr.LEUCOCITE $\times 10^3/\mu l$	<2, 0	>20
Nr.ERITROCITE $\times 10^6/\mu l$	<2, 0	
HEMOGLOBINĂ g/dl	<7, 0	
HEMATOCRIT %	<18, 0	>60
MCV fl	<65	>120
Nr.TROMBOCITE$\times 10^3/\mu l$	<50	>900
GRANULOCITE $\times 10^3/\mu l$	<1, 0 pt. un.nr.L < 4, 0	
LIMFOCITE %		>70
MONOCITE %		>25

BLAŞTI		>5

O importantă componentă a asigurării calităţii informaţiilor furnizate de HLG automată o reprezintă examinarea citologiei frotiului de sânge periferic de către medicul de laborator în conformitate cu procedura specifică PSL-H04-02 ,, Citologia frotiului sanguin’’.
Când instrumentul semnalizează anumite modificări, operatorul verifică datele şi asistentul întinde, colorează frotiurile şi le prezintă medicului.

Criterii de efectuare a frotiului sanguin

De regulă eozinofilia > 0, 7×10³/µl sau 20 %, monocitoza >10 % sau>1000/ µl, leucocitoza >30×10³/ µl, anemia, microcitoza, celulele atipice, limfoplasmocitele, trombocitopenia<40×10³/ µl, trombocitoza impun examenul morfologic complet pentru verificarea veridicităţii numărătorii automate.

4.11.VARIAŢIILE PATOLOGICE ALE PARAMETRILOR HEMATOLOGICI ALE SÂNGELUI PERIFERIC DETERMINATE PRIN HLG AUTOMATĂ.

I. Scăderea numărului de eritrocite; Scăderea HGB şi HCT.ANEMIA.
O.M.S. recomandă încadrarea în acest diagnostic când valorile HGB sunt la:
bărbatul adult < 13g/dl
femeia adultă <12g/dl
copil<6 ani=<11g/dl
copil 6-14 ani<12g/dl
Numărul de eritrocite, constantele şi indicii eritrocitari, hematocritul, RDW aduc informaţii suplimentare pentru precizarea diagnosticului.

A. Anemia hipocromă microcitară :HEM <27pg; VEM <80fl; CHEM<32 %
Se diferenţiază:
1. Anemia feriprivă hiposideremică:hemoragii cronice, malabsorbţie, sarcină, alăptare, perioade de creştere, infecţii, neoplazii, sindrom nefrotic.
2. Anemii sideroblastice prin defect de utilizare a Fe.
3. Talesemia.

B. Anemii macrocitare şi, , hipercrome ’’ : HEM>32pg; VEM>94fl .
1.Anemii megaloblastice prin carenţă de vitamina B12, primară sau secundară: anemia Biermer, botriocefaloză, maladiea Crohn, medicamentoasă, neoplazii.
2. Anemii megaloblastice prin carenţă de acid folic : carenţe nutritive, malabsorbţie, etc.
C. Anemii normocitare normocrome : HEM 28-32 pg; VEM 82-92 fl .
Caracterizează : anemiile hemolitice, hemoragiile acute, anemii refractare .

II . Creşterea numărului de eritrocite
RBC > 6×10^6/µl
HGB > 18 g/dl la barbaţi şi > 17g/dl la femei
HCT > 54 % la barbaţi şi > 51% la femei

1. Poliglobulia relativă : hemoconcentraţie prin sindroame de deshidratare.
2. Poliglobulia secundară : B.P.O.C., cardiopatii cianogene, hemoglobinopatii
3. Poliglobulia primitivă- Boala Vaquez, sindrom mieloproliferativ, idiopatic însoţit de leucocitoză şi trombocitoză.

III. Leucocitoza
1. Leucocitoza fiziologică : La nou născut aproximativ 25.000/µl; la copil 12000 - 14000/µl în sarcină, efort, stări emoţionale, caniculă.
2. Leucocitoză infecţioasă; infecţii bacteriene localizate sau sistemice, infecţii virale la debut sau perioade de incubaţie a bolilor infecţioase .
3.Leucocitoză post hemoragică .
4.Leucocitoză neinfecţioasă: neoplazii, boală de iradiere, metebolice.
Reacţii leucemoide: numarul de leucocite >30× 10^3/µl .
1.Mieloide: infectii grave, hemolize, intoxicaţii .
2.Limfoide: Boala Carl Smith, tuse convulsivă, mononucleoză infecţioasă . IV.Leucopenia. Scăderea numărului de leucocite <4×10^3/µl .
Se datorează frecvent unei neutropenii, PMN <3000/µl .
Poate fi :
-constitutională
-infecţioasă :virală, febra tifoidă, bruceloză, malarie, tuberculoză, fungică
-hemopatii: anemie aplastică, cronică, leucemii, sindrom Chediack-Higashi, hemoglobinuria paroxistică nocturnă .

V. Agranulocitoza .Scăderea PMN sub 500/µl .
-idiopatică
-secundară: medicamentoasă, substanţe chimice, infectii virale, infecţie cu Salmonella typhi, microbacterii, boală de iradiere, endocrine, neoplazii .

VI. Eozinopenie : febra tifoidă, tuberculoză, şoc, hemolize, anemie Biermer .

VII. Eoziofilie : cresterea numărului de eozinofile >4 % sau >400-500/µl .
1.Infecţioasă:scarlatină, dizenteria amebiană, varicelă, febră aftoasă, gonococie, oreion, herpes zoster, tuberculoză, lepră .
2. Post infecţioasă-convalescenţa bolilor infecţioase .
3. Parazitară :helmintiaza, echinococoză, trichineloză, toxocaroză, ankilostomiază, cisticercoză, f ascioloză hepatică, enterobiază etc.
4. Micoze: aspergiloză, coccidiomicoză .
5.Hemopatii maligne: leucemia cu eozinofile, boala Hodkin, limfadenopatie angioimunoblastică .
6. Neuro-vegetativă .
7. Alergică : urticarie, migrene, astm bronşic, rinită, boala serului, stări anafilactice .
8. Dermatologică : pemfigus bulos , dermatite herpetiforme, atopică, eczeme psoriazis .
9. Paraneoplazică : cancere metastatice, pulmonare, ovariene, seroase; melanom
10. De iradiere : radioterapie, raze X .
11. Boli endocrine: maladie Addison, mixedem .
12. Toxică: intoxicaţie cu arsenic, fosfor, benzen, acid sulfuric, barbiturice

13. Medicamentoasă :digitală, acetilcolină, salicilaţi, antipirină, fenotiazină etc.
14. Diferite afecţiuni: cologenoze, rahitism, glomerulonefrite, insuficienţă renală etc.

VIII. Bazofilia : >1% sau > 60/µl bazofile în formula leucocitară.
Valori moderate : diabet, dislipidemii, mixedem .
Valori importante: sindroame mieloproliferative cronice, leucemia cu bazofile, boala de iradiere, neoplazii etc.

IX. Limfocitoza
Fiziologică: la nou -născut, sugar ≥60 % dinF.L.
La copil, adolescent ≈35 %

1. Infecţioasă : mononucleoză infecţioasă, boala Karl Smith, rubeolă, rujeolă, oreion, toxoplasmoză etc.
2. Post infectioasă : convalescenţa bolilor infectioase .
3. Hemopatii: limfoame, sindrom Sézary, gamapatii monoclonale, anemie aplastică .
4. Endocrină : maladia Basedow, Addison, acromegalia, tetania etc.
5. Carenţială: avitaminoze, rahitism .
6. Boli metabolice: diabet, obezitate .
7. Alte afecţiuni : psihopatii, epilepsie, neurastenie .
8. Constituţională .
9. Toxică şi postmedicamentoasă .

X. Limfopenie. Frecvent se întâlneşte o limfopenie relativă corelată cu neutrofilia.
Limfopenie infecţioasă : febra tifoidă, tifos exantemic .

XI. Monocitoza > 10 % în FL; 1000/µl

1. Monocitoza infecţioasă .
2. Infecţia cu CMV; subiecţi imunodeprimaţi, transfuzaţi, transplantaţi, SIDA
3. Toxoplasmoza
4. Infecţii cu monocitoză fără leucocitoză:
   - Acute: rujeolă, varicelă, dizenterie, parotidită, encefalite, bruceloză, lozisteriă, hepatită virală .
   - Cronice: sifilis, tuberculoză, paludism, tripanosomiaza, etc.
5. Infecţii cu monocitoză şi leucocitoză: endocardită, anginâ Plaut- Vincent, difterie, variolă, febre exantematice .
6. Hemopatii : sindrom mielodisplazic, poliglobulie, limfoame, sarcoidoză, metaplazie mieloidă cu mielosclerozâ .
7. Boli de colagen: artrită reumatoidă, lupus eritematos sistemic.
8. Colită ulceroasă, enterite regionale .
9. Intoxicaţii şi reacţii postmedicamentoase .

XII. Monocitopenie < 200/µl
Apare în: infecţii acute, terapie cu corticosteroizi, citostatice, neoplazii.

XIII. Hiperplachetoza :400-800× 10³/µl plachete
Acompaniază:
1. Anemia post hemoragică acută, hemolitică, feriprivă .
2. Infecţii acute : septicemii, bronşite, scarlatine, etc.
3. Convalescenţa bolilor infecţioase.
4. Splenectomia .
5. Boli neoplazice : mezoteliom pleural, peritoneal, tumori maligne cu diverse localizări, limfoame .
6. Maladii prin mecanism imun : spondilită, colită ulceroasă, lupus eritematos sistemic, amiloidoză .

7. Cardiopatii cianogene, valvulopatii.
8. Caşexie, alcoolism cronic, agonie .
Trombocitemia : număr plachete >800×10³/µl
Esenţială:Trombocitemia hemoragică trombotică
Secundară: Sindroame mieloproliferative cronice, cancer de colon.

XIV. Trombocitopenie. Scăderea numărului de plachete sub 150×10³/µl dar mai ales < 50×10³/ µl .
•Trombocitopenie cu durată de viaţă a plachetelor scăzută prin distrucţie periferică dar cu număr normal sau crescut de megacariocite.
-Prin mecanism imun :
a) autoimunizare (autoanticorpi antiplachetari)
Fie idiopatică : maladia Werlhof- purpura trombocitopenică idiopatică.
Fie secundară unui agent identificabil;
-infecţii virale (varicelă, rubeolă, rujeolă, herpes, adenoviroze, gripa B)
-medicamente
-maladii de fond: lupus eritematos sistemic, limfoame
b) izoimunizare : incompatibilitate plachetară feto-maternală
Prin mecanism neimunologic: hipersplenism cu splenomegalie, infectii, ciroză splenomegalică, hipertensiune portală, tumori, fibrinoliză, sindrom de coagulare intravasculară diseminată, dializaţi .
•Trombocitopenic cu durată de viaţă a plachetelor normală şi defect central de formare : anemie Biermer, hemoglobinurie paroxistică nocturnă, metastaze medulare, limfoame, tezaurismoze, granuloame tuberculoase, leucemii acute, insuficienţă medulară din S.I.D.A sau seropozitivitate H.I.V., toxică, postmedicamentoasă, aplazii medulare, radiaţii, meningococcemie .

5. RESPONSABILITĂŢI

5.1. MANAGERUL
- aprobă programul de control extern de calitate
- aprobă planul de etalonare/ verificare metrologică a analizorului

5.2. MANAGERUL TEHNIC
-stabileşte împreuna cu şeful de compartiment programul de control extern interlaboratoare.
-verifică şi aprobă buletinul de analiză.

-asigură consultanţă privind rezultatul investigaţiei de laborator când clinicianul o solicită, când este indisponibil, este înlocuit de locţiitorul stabilit.

5.3. ŞEFUL DE COMPARTIMENT

-este responsabilul de analiză în timpul programului normal de lucru
-stabileşte programul de control intern şi extern.
-verifică şi validează rezultatele controlului intern de calitate.
-execută analizele de laborator de care este responsabil şi validează prin semnătură rezultatele .
-verifică şi validează rezultatele analizelor efectuate de asistentul de laborator din subordine .
-validează prin semnătură buletinul de analiză Cod. FGL-5.8-01.
- întocmeşte referatul de necesitate, cod FGL-4.6-02, Ed.1, Rev.0/

5.4. RESPONSABILI DE ANALIZĂ

-sunt medicii de laborator autorizaţi şi instruiţi pentru utilizarea analizorului hematologic
-execută analizele de laborator de care este responsabil şi validează prin semnătură rezultatele .
-verifică şi validează rezultatele analizelor efectuate de asistentul de laborator din subordine .
-asigură programul de lucru în compartimentul de hematologie în timpul contravizitelor zilnice şi sărbătorilor legale
-efectuează operaţiunile de mentenaţă stabilite în timpul programului de lucru pe analizorul hematologic şi le înregistrează în fişa de mentenanţă

5.5. ASISTENTUL MEDICAL DIN COMPARTIMENTUL DE RECOLTARE / PRELEVARE A PROBELOR BIOLOGICE

- recoltează probele de sânge de la beneficiarii externi, le inscripţionează cu ID-ul probei, completează formularul de solicitare din compartimentul respectiv, Cod F-PGL-5.4-1L.

5.6. ASISTENTUL DE LABORATOR

- execută şi întreţine operaţiunile de curăţare şi dezinfecţie pentru care a fost instruit

- inregsitreaza probele în registrul de lucru

5.7. RESPONSABILUL DE LA CAMERA DE RECEPTURĂ SI ASISTENTUL DE LABORATOR

- preia probele de sânge şi formularele de solicitare, înregistrează probele in softul medical si in registrul de comenzi interne
- identifica probele cu ID generat de soft

5.8. RESPONSABILUL CU ACTIVITATEA METROLOGICĂ

-întocmeşte planul de mentenanţă al analizorului

6. ÎNREGISTRĂRI

F-PGL-5.4.-1 L	Formulare de solicitare analize medicale hematologice
RGL -4.4.-01 I /E	Registru de evidenţă comenzi interne
RGL-4.4-02	Registru de evidenţă comenzi respinse
FGL 4.6-02	Referat de necesitate
FGL - 5.8-01	Buletin de analiză

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICĂ

CITOLOGIA FROTIULUI SANGUIN

COD: PSL-H4-02

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Responsabil Calitate
Lorena Zaborila

Elaborat:
Dr. Denisa Covaciuc

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment: Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Hematologie	2		Dr. Denisa Covaciuc					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1.SCOP ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

2. DOMENIUL DE APLICARE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

4.1. DEFINITII ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

4.2. ABREVIERI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

5. DESCRIEREA ACTIVITATII ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

6. RESPONSABILITATI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

7. INREGISTRARI ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

8. ANEXE ..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

1. SCOP ŞI DOMENIU DE APLICARE

Examenul morfologic al frotiului de sânge periferic reprezintă o importantă componeta a activităţii din compartimentul de hematologie deoarece:

-permite controlul valorilor numărătorilor automate efectuate pe analizorul de hematologie
- furnizează detatalii morfologice valoroase despre seriile eritrocitare, leucocitare, trombocitare, celule anormale.
- poate indica direct diagnosticul sau să formuleze sugestii pentru investigaţii suplimentare.

2. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ

2.1. SR EN ISO/CEI: 15189: 2007-Laboratoare medicale.Cerinţe particulare pentru calitate şi competentă.
2.2. SR EN ISO/TR: 22869-Laboratoare medicale.Ghid pentru implimentarea în laboratoare a ISO 15189: 2003.
2.3. SR EN 15190: 2005 –Laboratoare medicale.Cerinţe pentru securitate.
2.4. Manualul calităţii Laboratorului Cod MCL-01
2.5. Manualul de recoltare al probelor biologice’
2.6. POL-01 ,,Colectarea, depozitarea şi transportul deşeurilor infectioase ’’.
2.7. Kondi, V- ,,Laborator clinic –Hematologie ’’Ed. Med.1981 Bucureşti.
2.8. Paun, R - ,,Tratat de medicină internă-hematologie ’’ Ed. Med. 1999
2.9. Popa, G - ,,Actualităţi în hematologie’’ Ed. Junimea 1995.
2.10. M.S. –Academia de Ştiinţe Medicale- ,,Metode de laborator de uz curent’’ Ed. Med.1975 Bucureşti.
2.11. Ţiteica, M - ,,Practica laloratorului clinic-Hematologie ’’ Ed. Academiei 1984.

3.DEFINIŢII ŞI ABREVIERI

3.1. Definiţii

3.1.1. Reproductibilitate: se bazează pe măsurători din aceeaşi probă de sânge integral, proaspăt cu rezultate similare.
3.1.2. Acurateţea: apropierea dintre rezultatul unui test, analiză de laborator şi valoarea de referinţă acceptată.
3.1.3. Valoare de referinţă: o metodă descrisă tehnic clar şi exact pentru o procedură care şi-a dovedit suficientă acurateţe şi precizie în investigaţiile de laborator, permiţând a evalua validitatea altor metode de măsurare şi pentru caracterizarea materialelor de referinţă.

3.2. ABREVIERI

HLG – hemoleucograma
HGB – hemoglobină
HCT – hematocrit
E – eritrocite/hematii
L - leucocite
TR – trombocite/plachete

HEM –hemoglobină eritrocitară medie
CHEM – concentraţia în hemoglobină eritrocitară medie
PMN – polimorfo-nucleare neutrofile
FL – formulă leucocitară
DS – deviaţie stângă
A.- anemie
AHAI – anemie hemolitică autoimună
ARN – acid ribonucleic
ADN – acid dezoxiribonucleic
MGG – May-Grünwald Giemsa
LGC – leucemie granulocitară cronică
MMM – metaplazie mieloidă cu mielosclerozăă
LA – leucemie acută
CID – sindrom de coagulare vasculară diseminată
SMD – sindrom mielodisplazic
FAL – fosfatază alcalină leucocitară
CMV – virus citomegalic
HPN – hemoglobinurie paroxistică nocturnă

4. DESCRIEREA PROCEDURII

4.1. SEMNIFICAŢIE CLINICO-BIOLOGICĂ

Studiul morfologiei celularităţii sângelui periferic se realizează pe frotiuri întinse din sângele venos sau mai rar capilar recoltat în vacutainere de 2 ml, K_3 EDTA, (cu dop mov) care asigură în cea mai mare măsură acurateţea caracteristicilor elementelor sanguine.
Frotiurile se colorează panoptic MGG şi se examinează la microscopul optic iniţial cu obiectiv uscat şi apoi cu imersia.
Analiza informaţiilor obţinute din examinarea atentă şi completă a frotiurilor conduce fie la un diagnostic clinic, fie la sugerarea extinderii explorărilor hematologice: numărătoare de reticulocite, mielogramă, biopsie ganglionară, dozarea sideremiei etc.

4.2. RESURSE NECESARE
4.2.1. RESURSE MATERIALE

- lame de siclă cu o porţiune mătuită, bine curăţate şi degresate.
- lame şlefuite cu un vârf rupt (lamă rodată).
- lame şlefuite sterile, unice pentru fiecare pacient în cazul recoltei din pulpa degetului.
- soluţii May Grünwald şi Giemsa
- apă distilată neutră
- Ph indicator de hârtie
- soluţie de carbonat de sodiu 1 %
- ulei de cedru
- microscop optic
- pipete Pasteur, pipete gradate

4.2.2. RESURSE UMANE

- medic primar laborator clinic
- asistent principal laborator clinic

Măsuri de protecţie a personalului.
Toate produsele patologice sunt tratate ca şi cum ar fi potenţial infectate şi manipulate cu respectarea următoarelor reguli de bioprotecţie:
- intrare controlată; majoritatea bacteriilor manipulate în acest laborator sunt patogene pentru om.
- purtarea echipamentului de protecţie în spaţiile de lucru (halat, mănuşi, pe durata lucrului). La ieşire, echipamentul de protecţie se abandonează în spaţiul de risc.
- nu se pune nimic în gură: este interzis a bea, fuma, mânca.
- nu se pun obiecte personale pe masa de lucru.
- decontaminarea suprafeţelor de lucru cu soluţii dezinfectante avizate, obligatorie la închiderea lucrului.
- a se spăla pe mâini cu apă şi săpun şi soluţii dezinfectante de câte ori este nevoie şi la sfârşitul programului de lucru.

4.3. PRODUSUL BIOLOGIC ANALIZAT

Recoltarea probelor biologice pentru obţinerea de sânge venos sau capilar se face prin puncţie venoasa respectiv capilară- conform Manualului de recoltare probe pe vacutainere de 2 ml, K_3 EDTA, (cu dop mov), respectiv microtainere K_3 EDTA cu tubi capilar.
Probele recoltate în punctele de recoltă din spital vor fi recepţionate, verificate cantitativ şi calitativ şi înregistrate în registrul de comenzi interne primind un I.D. comun probei, formularului de solicitare de analiză şi registrului de lucru.
În compartimentul de hematologie, responsabilul de analiză validează din punct de vedere cantitativ şi calitativ proba bilologică, o înregistrează în registrul de lucru şi în computerul compartimentului racordat la analizorul de hematologie.
Precauţii standard:
Toate probele de sânge sunt considerate potenţial infecţioase şi manevrate în conformitate cu legislaţia naţională şi internaţională.
Criterii de respingere a probei biologice:
- identificare necoresunzătoare
- volum necorespunzător
- prezenţa de coaguli
- transport şi stocare defectuase
- plasma hemolizată ce indică o manevră de recoltare laborioasă cu disrtucţii tisulare şi posibil microcoaguli nedetectabili la examenul macroscopic.

Dacă proba nu este validată se anunţă telefonic asistenta de recoltare de necesitatea unei noi recolte.

4.4. DESCRIEREA ACTIVITĂŢII

După efectuarea HLG automate la analizorul hematologic, medicul selectează probele care necesită controlul morfologic şi examinare suplimentară pe frotiul hematologic colorat MGG.

Asistenta de laborator execută frotiul, prepară reactivii, colorează preparatul şi-l prezintă examinatorului.

4.4.1. Tehnica întinderii frotiului.

Din vacutainerul ce conţine proba de sânge selectată, se prelevă o picătură de sânge venos sau capilar; se pune picătura pe capătul din dreapta al unei lame care stă pe masa de lucru.Lama de întins (o lamă diferită şi ciobită la un colţ, ca să fie mai mică decât cea pe care se execută frotiul), se aplică mai la stânga pe lamă, întrun unghi de aproximativ 45°. Se aduce lama de întins spre dreapta, până atinge picătura de sânge.Aceasta se întinde rapid în unghiul format de lama de întins.

Cu un gest uniform se împinge lama de întins într-o mişcare de translaţie în lungul lamei.Preparatul se usucă foarte repede prin agitare în aer.Acest timp reprezintă o primă fixare.Este recomandabil să se execute două frotiuri, unul păstrându-se ca rezervă.Pe lamă se scrie numele bolnavului (cu un vârf de ac, colţul unei lame sau creionul) şi se pune la colorat.

Calităţile unui frotiu.

Un frotiu este reuşit dacă:

a) este mai îngust decât lama

b) nu acoperă toată lama, are margini drepte şi franjuri la extremitatea terminală.

c)are o grosime potrivită astfel încât celulele să fie întrun singur plan, distribuite uniform, să nu fie distruse sau deformate.

Frotiul nereuşit este gros, neuniform, uscat lent sau când lama este nedegresată.

Frotiurile din sânge capilar, executate direct din picătura de puncţie, sunt superioare calitativ celor din sânge venos întrucât morfologia celulelor este complet consevată iar studiul plachetelor permite şi aprecierea gradului de agregabilitate în grupe celulare.

Frotiul se colorează cât mai curând posibil întrucât în lamele nefixate şi necolorate celulele se degradează pierzându-şi afinitatea tinctorială.

4.2.2. Metoda coloraţiei May-Grünwald-Giemsa

A. Principiul metodei

Este o coloraţie panoptică care oferă numeroase detalii morfologice şi de aceea este considerată deosebit de preţioasă în hematologia curentă.

Colorarea unui frotiu poate fi efectuată imediat după întindere sau în primele 24 de ore de la preparare.Datorită amestecului de coloranţi acizi, bazici şi neutri, se vor colora toate componentele celulei sanguine în funcţie afinităţile tinctoriale.

Compoziţia soluţiilor colorante.

Soluţia May-Grünwald:
- eozinat de albastru de metilen 1g
- glicerină neutră p.a. 50ml
- alcool metilic p.a. 100ml
-alcool metilic p.a. 200ml

Soluţa Giemsa:
- eozinat de azur de metilen 3g
- azur de metilen 0, 8g
- glicerină neutră p.a. 200ml

Reactivii sunt achiziţionaţi pe baza referatului de necesitate, sunt gata preparaţi excluzând astfel eventualele erori umane, de cântărire, preparare.

Au certificat de calitate.

Pentru a realiza o coloraţie cu cele mai frumoase nuanţe cromatice trebuie utilizată apă neutră.Controlul neutralităţii apei se realizează cu hârtie pH-indicatoare.

Apa distilată are pH acid 7 – 7, 2.Neutralizarea ei se obţine adăugând câteva picături dintr-o soluţie slab alcalină de carbonat de sodiu 1% la 500ml apă distilată.

Coloraţia MGG dă indicaţie asupra pH-ului componentelor celulare. Astfel, coloranţii acizi sunt fixaţi de porţiunile alcaline ale celulei, care sunt acidofile, iar coloranţii bazici sunt fixaţi de părţile acide, deci sunt bazofile.
Coloranţi acizi: eozina
Coloranţi bazici: albastrul de metilen, eozinat de azur de metilen.
Astfel eozina este fixată de granulaţiile eozinofile care sunt alcaline; albastrul de metilen este fixat de ARN –ul citoplasmatic colorând-o în albastru ; azurul de metilen este fixat de ADN nuclear colorându-l în violet purpuriu.Nucleolul fixează albastrul de metilen deoarece conţine ARN de tip citoplasmatic colorându-se în albastru.
Cu cât o celulă este mai tânără cu atât citoplasma sa este mai bazofilă datorită concentraţiei în ARN.Pe măsura maturării, celulela devine tot mai oxifilă deoarece scade concentraţia de ARN. (exemplu evoluţia eritroblaştilor)

Termenii oxifil, acidofil, eozinofil sunt sinonime care indică afinitatea pentru coloranţii acizi.

B.Tehnica de colorare May-Grünwald Giemsa a frotiului de sânge periferic.
a) Fixarea.Se acoperă frotiul cu un număr cunoscut de picături din soluţia May-Grünwald şi se lasă 2-3 minute.
b) Colorarea se face în doi timpi:
-timpul 1: se adaugă peste soluţia M.G. un număr egal de picături de apă tamponată, se omogenizează şi se lasă 2 minute.
-timpul 2: se varsă soluţia de pe lamă şi fără să se spele se acoperă cu soluţie Giemsa preparată extemporaneu. O picătură soluţie Giemsa concentrată la 1 ml apă tamponată.Se lasă în repaos 20 minute.Se spală cu apă de robinet se şterge dosul lamei, se lasă în stativ pentru uscare.
Dacă apa tamponată a fost alcalină, frotiul este albastru închis, dacă a fost acidă, frotiul este roşu aprins. În ambele situaţii examenul morfologic este dificil şi lipsit de acurateţe.

4.4.3. EXAMENUL FROTIULUI DE SÂNGE

I. Examinarea macroscopică urmăreşte aprecierea calităţilor de întindere şi colorare ale frotiului.
Un frotiu subţire, uniform, cu margini paralele, terminat în franjuri de culoare roz violaceu va asigura un examen microscopic corespunzător.
II. Examinarea microscopică urmăreşte:
a) cu obiectiv uscat (× 40)
-densitatea şi distribuţia celulară, realizând estimări semicantitative şi confruntând rezultatele numărătorii automate.
-tinctorialitatea celulară.
-prezenţa de celule anormale, atipice.
-alegerea zonei adecvate pentru examinarea cu obiectivul cu imersie.
De obicei la unirea 1/3 medie cu 1/3 terminală etalarea celulelor este optimă pentru a efectua analiza morfologică detaliată.
b) Examenul microscopic cu obiectivul cu imersie.

Se examinează pe rând: morfologia eritrocitelor, frecvenţa şi morfologia trombocitelor, frecvenţa şi morfologia leucocitelor cu întocmirea FL.
Se recomandă această ordine de examinare deoarece dacă se începe cu studiul leucocitelor, atractiv şi spectaculos prin variaţiile de formă, structură şi culoare, există riscul omiterii evidenţierii anomaliilor eritrocitelor şi trombocitelor indispensabile conturării unui diagnostic concludent.
Analiza coroborată a informaţiilor examenului microscopic permite ,,Diagnosticul de celulă'', precizându-se:
• Seria celulară din care face parte: elemente proprii ţesutului hematopoietic (granulocitare, eritrocitare, megakariocitare); seria limfocitară, seria monocito- macrofagică.
• Tipul celulei din seria respectivă urmărind talia, structura nucleului, prezenţa nucleolilor, tinctorialitatea citoplasmei, particularităţi morfologice nucleare şi/sau citoplasmatice.

•Vârsta celulei: diferenţierea elementului tânăr ,,blast '', de cel matur ,,cit ''.

Caracteristicile vârstei celulelor

Caractere morfologice	,,BLAST ''	,,CIT ''
Talie	Celulă mare	Celulă mai mică
Raport nucleo - citoplasmatic	În favoarea nucleului	În favoarea citoplasmei
Citoplasmă	Bazofilă	Oxofilă
Reţea cromatiniană	fină	densă
Nucleol	Prezenţi obligatoriu	absenţi

• Prezenţa elementelor anormale respectiv blaşti, celule metastatice, paraziţi.
• Dispoziţia particulară a celulelor.

4.4.3.1. Morfologia elementelor normale din sângele periferic examinate cu imersia

• Eritrocite normale au forma unui disc biconcav cu diametrul de 7, 2 µ de culoare roz portocalie (acidofile datorită conţinutului în HGB) cu centrul mai puţin colorat, clar. Se apreciază talia, forma, culoarea, dispoziţia; sunt normocitare, normocrome.
• Trombocitele sunt elemente mici cu diametrul de 2 -4 µ. Formă sferică, ovoidală, neregulată cu granulaţii azurofile în centru (granulomer) şi periferia albastră (hialomer).
• Leucocitele sunt reprezentate de granulocite nesegmentate şi segmentate diferenţiate prin granulaţii specifice neutrofile, eozinofile, bazofile şi elemente mononucleate, respectiv limfocite şi monocite.

Identificarea diverselor tipuri de leucocite se bazează pe următoarele caracteristici:
- mărimea
- forma, poziţia, structura cromatiniană a nucleului
- culoarea, cantitatea citoplasmei; raportul nucleo-citoplasmatic
- număr, culoare, mărime, distribuţie a granulaţiilor
- prezenţa şi aspectul nucleolilor

Ansamblul acestor caracteristici va asigura identificarea celulară.

Granulocitele au dimensiunea de 12-15µ. Nucleul mare, structura cromatiniană foarte densă, cu benzi grosiere de bazicromatină despărţite de spaţii fine de oxicromatină, segmentat în 3-5 lobi, colorat în violet închis.
Citoplasma oxifilă în care se delimitează granulaţiile neutrofile, eozinofile, bazofile.
Granulaţiile neutrofile: fine, rotunde, numeroase, culoare brună.
Granulaţiile eozinofile: mari, rotunde ca ,,icrele de Manciuria'', portocalii brun roşcat.
Granulaţiile bazofile: mari, neregulate, inegale, brun închis; apar şi pe nucleu.
Limfocitele se diferenţiază în mari, mijlocii şi mici cu diametrul între 6, 2-16µ, nucleul mare, rotund, cromatină densă, violet închis, agregată în grămezi mari compacte, fără nucleol, citoplasmă redusă cantitativ, bazofilă, uneori cu câteva granulaţii azurofile foarte închise la culoare.
Monocitele sunt celule mari cu diametrul 20-25µ, nucleu mare, extrem de variat ca formă, structură cromatiniamă fină, citoplasmă albastru cenuşiu cu fine granulaţii azurofile.
Diferenţierea şi clasificarea procentuală a diverselor tipuri de leucocite prezente pe frotiul sanguin reprezintă ,,formula leucocitară'', respectiv numarătoarea diferenţiată a leucocitelor.
Tehnica de efectuare a FL: pe frotiu se pune o picătură de ulei de cedru şi se fixează poziţia obiectivului folosind macroviza apoi microviza microscopului optic cu diafragmul deschis şi condensatorul sus.
Lama se deplasează în aşa fel încât marginea frotiului să fie examinată în zig zag, într-o singură direcţie pentru a nu citi de două ori aceeaşi porţiune.
Pe masură ce se traversează frotiul leucocitele se notează pe un tabel în dreptul simbolului consemnat. Se numără 200 de elemente sau mai multe şi se face procentajul fiecărei clase.

Formula leucocitară normală

Leucocite	Nou-născut	Sugar	Copil (6 ani)	Adult	Valori absolute
	15.000 - 30.000	9.000 - 15.000	4.000 - 10.000	4.000 - 8.000	

Neutrofil nesegmentat	1 -5 %	1 -5 %	5 %	1 -4 %	50 -200
Neutrofil segmentat	30-70 %	25-30 %	30-60 %	60-70 %	3.000-4.800
Eozinofil	2 -5 %	7 %	4 %	1 -4 %	300-400
Bazofil	0 -1 %	1 %	1 %	0 -1 %	20-80
Limfocit	20-40 %	50-70 %	30-60 %	25-30 %	1.500-2.400
Monocit	2 -8 %	6 -8 %	4 -8 %	4 -8 %	240-600
Plasmocit	0	0	0	0 -0, 5 %	10-40

Efectuarea FL este cerinţa cel mai frecvent solicitată de clinician, contribuind la precizarea unui diagnostic şi instituirea terapiei.
Erori ale rezultatelor comunicate la efectuarea FL.
1. Eroare mecanică dată de imperfecţiunile executării frotiului.
Elementele se distribuie neumiform, cele de talie mare marginalizează, se adună în franjuri perturbând procentele.
2. Erori de interpretare care ţin de gradul de instrucţie şi performanţa profesională a examinatorului.
3. Erori de eşantionaj. Nu pot fi evitate decât încercând examinarea unui număr cât mai mare de celule ce va putea permite concluzii despre întreaga populaţie sanguină.

4.4.3.2. Aspecte anormale ale elementelor celulare ale frotiului de sânge periferic

I. Modificări patologice ale eritrocitelor
• Modificări morfologice de talie:
- ANIZOCITOZA reprezintă inegalitatea de mărime a eritrocitelor semn al existenţei de populaţii de vârste diferite.
Gradul de variaţie a mărimii se exprimă sub formă: uşoară +, medie ++, marcată+++.
- MICROCITOZA: hematii cu diametrul sub 7, 2μ, frecvent hipocrome sau microsferocite (hematii rotunde, uniform colorate, lipsite de zona clară centrală).
-MACROCITOZA: hematii ce depăşesc 9μ diametru, apar bine colorate, oxifile; cele ce depăşesc 12μ sunt megalocite, respectiv hematii gigante, ovalocitare, uniform colorate.

• Modificări morfologice de tinctorialitate:
- ANIZOCROMIE: prezenţa pe frotiu de eritrocite normo, hipo ,,, hiper’’ crome.
- POLICROMATOFILIE: prezenţa de E. cu tentă cenuşie reprezentate de reticulocite (macrocite policromatofile).Indică regenerare hematopoietică.
- HIPOCROMIA – E. palide, sunt slab încărcate în HGB, aceasta fiind concentrată la periferie ; uneori când HEM e mult scăzut, hematia devine inelară (anulocit).

-,HIPERCROMIA’’ – noţiunea nu este reală întrucât CHEM nu depăşeşte 36 ± 2 % dar aspectul sferocitelor, macrocitelor, megalo-ovalocitelor poate sugera această formulare indusă de creşterea grosimii celulei.

•Modificări morfologice de formulă:
Sunt variate şi numeroase constituind repere importante în diagnosticul anemiilor
POIKILOCITOZA: deformare pronunţată a E. care iau formă de rachetă de tenis, pară, ovalară, contur neregulat, dantelat.
SFEROCITE: E.mici, rotunde intens şi uniform colorate cu diametrul de aproximativ 4µ
STOMATOCITE: E. sferice cu zona centrală sub forma unei fisuri.
CELULE ,,ÎN ŢINTĂ’’: E. cu centrul şi periferia bine colorate în roz, despărţite de o zonă inelară clară.
DACROCITE: E. ,,în lacrimă’’, piriforme, uniform colorate.
ACANTOCITE: E. cu membrana citoplasmatică deformată, neregulată.
SCHIZOCITE: fragmente eritrocitare, E. în ,,coif’’ sau ,,coajă de ou’’.
DREPANOCITE: sunt hematii în ,,semilună’’ sau seceră, virgulă.
Apar mai sugestiv dacă sângele este lăsat mai mult între lamă şi lamelă sau se adaugă substanţe reducătoare.
LEPTOCITE: sunt hematii lenticulare, uniform colorate cu membrana citoplasmatică deformate

INCLUZII ERITROCITARE
Sunt întotdeauna anormale şi trebuie menţionate.
INELE CABOT: filamente inelare azurofile provenite din fibrilele fusului de mitoză.
CORPUSCULI JOLLY: resturi de cromatină nucleară, dispuse în citoplasmă, rotunde cu aspect dens, picnotic, colorate violet închis.
PUNCTAŢII BAZOFILE: granule numeroase, neregulate, inegale răspândite uniform în citoplasmă, colorate în albastru verzui.
CORPUSCULII HEINZ: granule mici, rotunde, puţine ca număr, aşezate la periferia celulei, mai frecvent izolate, unice. Nu se colorează panoptic MGG ci numai cu albastru de Nil, violet metil sau albastru de briliant crezil.
•Modificări de dispunere: aşezare a hematiilor ,,în rulouri ’’.

II. Modificări morfologice ale leucocitelor;
Anomalii nucleare şi citoplasmatice
Variaţii de talie:
ANIZOCITOZA: există o anizocitoză fiziologică care devine pronunţată în condiţii patologice.
Granulocitele gigante depăşesc cu 4-5µ dimensiunile unui granulocit normal.
Când sunt şi hipersegmentate se numesc macropolicite.
Pleiocariocitele prezintă 6-8-10 lobi maturându-se amitotic din promielocite.
Karioschize: mici pedicoli ai nucleului, uneori foarte numeroşi.
Granulaţiile toxice: granulaţii multiple, imature burând citoplasma granulocitelor.
Umbre nucleare Gumprecht : vestigii nucleare oxifile care apar datorită acţiunii mecanice de întindere asupra unor celule cu fragilitate crescută.
Limfocite tip Rieder: nucleul prezintă o incizură profundă;citoplasmă hiperbazofilă
Vacuolizări citoplasmatice ale PMN şi monocitelor – formaţiuni rotunde, clare ce înlocuiesc citoplasma, uneori multilpe.

Celule Sézary: limfocite mici cu nuclei convoluţi, voluminoşi, neregulaţi, citoplasmă redusă bazofilă.
Tricholeucocite (hairy cells): monocleare cu citoplasma în franjuri şi fine granulaţii azurofile.
Celule mononucleate reacţionale ,,mononucleozice ’’- celule mari cu nuclei polimorfi şi citoplasme hiperbazofile uneori cu vestigii nucleolare.

III. Anomalii morfologice ale trombocitelor
Anizocitoză plachetară, displazii ale granulomerului şi /sau hialomerului macro/ megalocite, dispunere în ,,plaje’’.

4.5. CONTROLUL DE CALITATE

Este asigurat prin respectarea riguroasă a cerinţelor tehnice de execuţie a frotiului, folosirea de reactivi ce posedă certificat de calitate, examinare temeinică de către medic primar de specialitate, cu experienţă.

4.6. PERFORMANŢELE METODEI

Examenul morfologic al citologiei frotiului de sânge periferic este indispensabil unui diagnostic rapid, complet şi corect cât şi iniţierii unei anumite terapii.
,,Sângele este un ordinator care transmite mesaje, oglindă în care se reflectă bolile viscerale ’’- Jean Bernard.
Frotiul de sânge poate să indice direct diagnosticul fie să asigure sugestii pentru extinderea explorărilor paraclinice.
Exactitatea metodei, acurateţea şi reproductibilitatea ei sunt asigurate de respectarea etapelor de lucru şi a parametrilor de calitate standardizaţi.

4.7. ACTIVITĂŢI FINALE

Frotiurile hematologice cu modificări importante sunt păstrate 1-2 săptămâni pentru eventuale reexaminări. Celelalte frotiuri sunt introduse în borcan cu sulfocrom pentru decontaminare şi după 24 de ore supuse metodologiei de pregătire a lamelor de microscop.

4.8. REZULTATE ŞI INTERPRETARE

Rezultatele analizei morfologice pe serii hematopoietice, limfocitare, monocito-macrofagice, formula leucocitară, uneori diagnosticul clinic sau sugestiile pentru investigaţii suplimentare sunt introduse manual în calculator pentru a configura buletinul de analiză Cod FGL 5.8.-01
Deşi medicina modernă beneficiază de progresele cercetării tehnico-ştiinţifice, biologiei moleculare, aportul adus de examinarea microscopică a preparatului de sânge periferic rămâne preţios şi de neeludat.

Modificări morfologice ale frotiului de sânge periferic sugestive de boală şi investigaţiile indicate

Modificări pe frotiu	Boala sugerată	Investigaţii indicate
Hipocromie +microcitoză	A. feriprivă A. cronică în infecţii	Hemosiderină medulară, sideremie
Hipocromie +macrocite policromatofile	HPN	Testul HAM
Hipocromie +punctaţii bazofile	A. saturnină	Plumbemie/urie
Hipocromie, poikilocitoză, hematii în ,,ţintă'', schizocite	Talasemie	Electroforeza HGB
Hipocromie, microcitoză, anulocite	A. cronică în infecţii	Hemosiderină medulară
Sferocite +policromatofilie	A. hemolitică (sferocitoză ereditară)	Autohemoliză ± glucoză
Sferocite +policromatofilie + aglutinare + DS	AHAI (criză)	Testul Coombs
Schizocite, policromatofilie, rare TR.	CID A.microangiopatică	coagulogramă
Dacriocite+bazofile+granulaţii imature +eritroblaşti + TR.displazice	MMM	Biopsie medulară
Eritrocite ,,în ţintă'', drepanocite	Siclemie	Electroforeză HGB

Modificări pe frotiu	Boala sugerată	Investigaţii indicate
E. în rulouri +tablou leucoeritroblastic ±limfocite reacţionale	Mielom multiplu	Mielograma

Macromegalocitoză, gigantism celular, DS, hipersegment-tarea PMN	A. megaloblastică	Mielogramă Dozare vit. B12
Microsferocite, plicromatofilie	Sferocitoză eritrocitară	Det HGB alcalino rezistente
Stomatocite+macrocite	Stomatocitoză eredi-tară, alcoolism, ciroze	Teste hepatice
Punctaţii bazofile în E.	Saturnism A.megaloblastice, talase-mie	Dozarea Pb mielogramă Electroforeza HGB
Inele Cabot, corpusculi Jolly	A. megaloblastice SMD	mielogramă
Corpusculi Heinz	Intoxicaţii methemoglobinizante	Dozări toxicologice
Leuzocitoză, DS, granulaţii toxice, vacuorizări MONO.şi PMN	Reacţie leucemoidă mieloidă, infecţii grave	Fosfatază alcalină leucocitară
Leucocitoză, DS, bazofilie, eozinofilie	LGC	FAL, cariotip
Tablou leucoeritroblastic +DS, Leucopenie, celule atipice, TR. crescute	Neoplazii	Mielogramă Explorări imagistice

Modificări pe frotiu	Boala sugerată	Investigaţii indicate
Leucocitoză, limfocitoză, umbre Gumprecht	Leucemie limfatică cronică	Imunofenotipare Ex. clinic
Celule ,,hairy’’+monocito-penie ± neutropenie	,,Hairy cells leukemia’’	Biopsia măduvii osoase

Limfocite cu nucleu con-volut	Sindrom Sézary	Imunofenotipare
Leucocitoză+limfomono-citoză+celule ,,monucleozice'' bazofile	M. I.	Reacţia Paul Bunnell Ig M Epsein Baar
Anemie+trombocitopenie+ blaşti atipici+hiatus leuce-mic	Leucemie acută	Mielogramă citochimie imunofenotipare
Macro-megalotrombocite + Hiperplachetoză+bazofilie ± corpi Jolly	MMM	Biopsie M.O.
Eozinofilia ± leucocitoză	Scarlatină Boli parazitare	Examen faringian pt.SBH Ex. coproparazitologic
Leucocitoză majoră +limfo-citoză monomorfă	Tuse convulsivă	Ex. clinic
Plasmocitoză ±leucopenie ± trombocitopenie	Rubeolă Alte boli infecţioase	Reacţii serologice în con-cordanţă cu ex. clinic
Monocitoză ± limfocite reacţionale	Infecţie CMV Alte boli infecţioase Boli diareice	Serologie HIV Ex. Clinic coprocultură

5. RESPONSABILITATI

5.1. RESPONSABILI DE ANALIZĂ

- evalueaza frotiurile sanguine.
- verifică şi validează rezultatele.
- inregsitreaza rezultatele în registrul de lucru

5.2. ASISTENTUL DE LABORATOR

- pregateste frotiurile in vederea evaluarii

- inregsitreaza probele în registrul de lucru

6. INREGISTRARI

- RGL 4.4-0.3 –L Registru de analiza

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICA

NUMARATOARE DE RETICULOCITE

COD: PSL – H04-03

Editia 1, Revizia 0

Din data de
01.05.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr Rodica Fantanaru

VERIFICAT
Responsabil Calitate
As.Lorena Zaborila

Elaborat:
Sef compartiment hematologie
Dr Denisa Covaciuc

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Hematologie	2.		Dr. Denisa Covaciuc					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1. SCOP SI DOMENIU DE APLICARE 5

2. DOCUMENTE DE REFERINTA 5

3.DEFINITII SI ABREVIERI 5

3.1.Definitii 5

3.2. Prescurtari 5

4.DESCRIEREA PROCEDURII 6

4.1. Semnificatie clinica 6

4.2. Principiul metodei 6

4.3. Resursele necesare 6

4.4. Produsul biologic de analizat 6

4.5.Descrierea activitatii 6

4.6.Activitati finale 7

4.7.Valori de referinta 7

5.RESPONSABILITATI 8

6.INREGISTARI SI ANEXE 9

1. SCOP SI DOMENIU DE APLICARE

Prezenta procedura descrie modul de operare si desfasurare a activitatii pentru determinarea numarului de reticulocite din sangele periferic.
Procedura se foloseste in compartimentul de hematologie al laboratorului de probe de sange venos sau capilar recoltat pe K3EDTA.

2. DOCUMENTE DE REFERINTA

2.1. SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;
2.2. SR EN ISO:22869 Laboratoare medicale .Ghid pentru implementarea in laboratoare a ISO 15189:2003
2.3.SR EN ISO 15190:2005-Laboratoare medicale –Cerinte pentru securitate

2.4. MANUALUL CALITATII, Cod: MCL – 01

2.5. R. Paun -"Tratat de medicina interna "-Hematologie,Ed Medicala,Bucuresti,1999

2.6. V. Kondi -"Laboratorul clinic –Hematologie ,Ed Medicala1981

2.7. M.S. Academia de stiinte medicale –"Metode curente pentru analize de laborator clinic"

2.8.Manualul de recoltare al probelor biologice - MRP

3.DEFINITII SI ABREVIERI

3.1.Definitii
Reticulocitul este un eritrocit imatur care mai pastreaza ribonucleoproteine si organite celulare.

3.2. Prescurtari

Rt-reticulocit
Sf-ser fiziologic
Ht-hematocrit
I.R.-indice eritrocitar
M.o-microscop optic

4.DESCRIEREA PROCEDURII

4.1. Semnificatie clinica

Numaratoarea reticulocitelor este un test specific de aprecirere a activitatii eritropoietice medulare util in interpretatrea mecanismului de producere si a raspunsului terapeutic in anemii.

4.2. Principiul metodei

Ribonucleoproteinele eritrocitare sunt precipitate si colorate cu solutie de albastru briliant cresyl 1% in s.f..

4.3.RESURSELE NECESARE

4.3.1.Resursele materiale :

- eprubete din sticla sterilizate la etuva ;
- lame din sticla bine colorate si degresate ;
- lama slefuita cu un colt rupt ;
- solutie albastru briliant cresyl 1% in s.f. ;
- pipeta ;
- ulei de cedru ;
- microscop optic.

4.3.2.Resursele umane :

- medic ;
- asistent.

4.4.PRODUSUL BIOLOGIC DE ANALIZAT

Sange venos sau capilar recoltat pe K3EDTA conform PGL 5.4.1. Manualul de recoltare.
Responsabilul de analiza receptioneaza proba ,verifica identitatea acesteia ,daca corespunde cantiativ si calitativ.
Precautii standard :orice produs se considera potential infectios si se manevreaza in conformitate cu legislatia nationala si internationala

4.5 Descrierea activitatii

4.5.1.Tehnica numaratorii de Rt

Asistenta de laborator amesteca intr-o eprubeta 6 picaturi din solutia de albastru briliant cresyl 1% in s.f. cu 12 picaturi de sange prelevate din vacutainerul indicat de medic.
Se lasa in repaos in stativ 1,5-2 ore pentru sedimentare spontana a hematiilor. Se arunca supernatantul.Din sediment se intind frotiuri subtiri.Se usuca in stativ.Se examineaza la m.o. cu obiectivul cu imersie.
Pe frotiurile colrate supravital eritrocitele apar colorate palid albastru verzui iar reticulocitele contin precipitate albastru inchis sub forma de retea granulofilamentoasa densa sau granule mici,izolate,uneori punctiforme.
Se numara o mie de eritrocite notandu-se separat Rt.
Rezultatele se comunica exprimate la % sau la %o ;mai corect in numar absolut.

4.5.2 Controlul de calitate

Calitatea executiei acestei tehnici este asigurata de respectarea metodologiei de lucru :pregatirea lamelor,calitatea reactivului,intinderea frotiurilor,acuratetea examinarii micoscopice.

4.5.3 Performantele metodei

Colorantul albasstru briliant cresyl in s.f.1% ofera avantajul obtinerii de frotiuri subtiri cu elemente bine colorate,distincte,sugestive,asigurand metodei o buna sensibilitate si reproductibilitate.

4.6. Activitati finale

Lamele colorate sunt mentinute in solutie decontaminanta sulfo-cromica timp de 24 h apoi urmeaza circuitul pregatirii lamelor in laborator conform **IL**

4.7.Rezultate si interpretare

Valorile normale apar tiparite in Buletinul de analiza **Cod FGL 5.8-01**

4.7.1.Valori de referinta
Valori procentuale :0,5%-1,5%
Valori in numar absolut 25.000-70.000/µl.
Pentru a estima cu cea mai mare precizie numarul de Rt decat procentual se foloseste uneori »indicele reticulocitar « :

IR=Rt(%) X Ht pacient/Ht normal(45)x1/2

Valoarea normala a I.R.=1.Creste in hiperplazii eritrocitare.

4.7.2.Interpretarea rezultatelor

Numaratoarea Rt in sangele periferic evalueaza activitatea eritropoietica medulara marcand caracterul regenerativ ,hipo sau a-regenerativ al unei anemii.
Este un indicator pretios in stabilirea gravitatii si prognosticului oricarui sindrom anemic.
Reticiocitopenia impune efectuarea mielogramei.

Anomalii cantitative ale numarului de Rt

Numar crescut de Rt	Numar scazut de Rt
Fiziologic la nn(1-4,5%)	
Anemie posthemoragica	Anemie aplastica
Anemie hemolitica	Anemie hipocroma(feripriva,din infectii)
Raspuns reticulocitar dupa terapie cu Fe,vitamina B12,B6,ac.folic « criza reticulocitara « confirma eficienta terapiei	Anemie megaloblastica
Post splenectomie	Anemie diseritropoietica refractara
	Anemie paraneoplazica
	Radioterapie

5.RESPONSABILITATI

5.1. Managerul tehnic

- verifica si aproba buletinul de analiza cod FGL 5.8-01.

5.2 Seful de compartiment

- efectueaza analiza microscopica a frotiului ;
- intocmeste si tipareste buletinul de analiza cod FGL 5.8-01
- semneaza si parafeaza buletinul de analiza cod FGL 5.8-01

5.3. Responsabilul de analiza

- efectueaza analiza microscopica ;
- trece rezultatul in registru de analiza cod RGL-4.4-0.3-L si in computer ;
- intocmeste si tipareste buletinul de analiza cod FGL-5.8.-01.

5.4.Asistenta de laborator :

- recolteaza sangele venos sau capilar ;
- executa frotiul.

5.5.Infirmiera

- executa si intretine curatenia in laborator ;
- colecteaza si depoziteaza reziduurile de probe si deseurile auxiliare,conform instructiunilor de lucru.

6. INREGISTRARI SI ANEXE

- FGL 5.8-01-Buletin de analiza
- RGL 4.4-0.3 –L Registru de analiza

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICA

DETERMINAREA VSH

COD: PSL-H4-04

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Responsabil Calitate
As. Lorena Zaborila

Elaborat:
Sef Compartiment hematologie
Dr Denisa Covaciuc

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Hematologie	2.		Dr. Denisa Covaciuc					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1. SCOP..... 5

2. DOMENIUL DE APLICARE 5

3. DOCUMENTE DE REFERINTA..... 5

4.DEFINITII SI ABREVIERI 5

5.DESCRIERE PROCEDURA…….....6

6.RESPONSABILITATI..... 8

7.INREGISTRARI 9

1. SCOP

Scopul acestei proceduri este de a prezenta modul de organizare si desfasurare a activitatii de executare a determinarii VSH, in conformitate cu metodele uzuale de laborator si normele de calitate in vigoare.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Acesta procedura se aplica in compartimentul Hematologie al Laboratorului de analize medicale din Spitalul de Boli Infectioase Iasi.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

3.1. SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;

3.2. SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.

3.3. MANUALUL CALITATII, Cod: MCL – 01

3.4. Kondi V. Laborator clinic –Hematologie, Ed .Medicala 1981

4.DEFINITII SI ABREVIERI

4.1.Definitii

VSH-viteza de sedimentare a hematiilor-rata de sedimentare a eritrocitelor „in vitro”intr-o proba de sange recoltat pe anticoagulant si lasat in repaos.

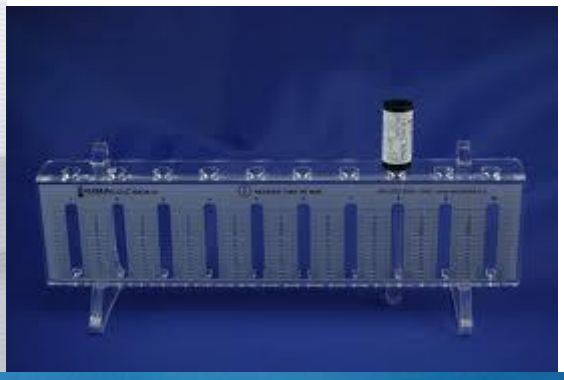
4.2. Prescurtari

MCL - Manualul Calităţii
PSL-procedura specifica de Laborator
PGL - Procedură Generală de Laborator
ID-cod unic de identificare al pacientului.
MRL-Manualul de recoltare

5.DESCRIEREA PROCEDURII

5.1. Echipamente

5.1.1. Stativ de sedimentare –suportul din plastic cu locusuri in care se asaza vertical vacuetele



5.1.2. Vacuetele din plastic cu dop negru cu anticoagulante sodium citrat 3, 8%

5.1.3. Cronometru

5.2.Modul de lucru

5.2.1 Principiul metodei.
VSH reprezinta viteza de sedimentare a hematiilor si masoara indirect gradul de inflamatie tisulara.Este o reactie de disproteinemie intrucat modificarile sunt conditionate de variatiile cantitative ale fibrinogenului si a alfa-globulinelor.
.

5.2.2. Factori de interferenta :
-inclinarea tubului ;
-temperatura ambianta (VSH creste cu temperatura) ;
-timpul scurs de le recoltare –sa nu depaseasca 6 ore ;
-refrigerarea scade valoarea VSH.

5.2.3.Reactivi-solutie izotonica sterila de citrat de trisodic 3, 8%

5.2.4. Prelevarea produsului patologic

Se realizeaza conform **Manualul de recoltare probe, MRP.**

5.2.5 Transportul produsului patologic
Se realizeaza cu respectarea regulilor de protectie a mediului si a personalului medical(tuburi inchise manipulate cu manusi de latex in cutii etanse).

5.2.6.Tehnica de lucru
Vacuetele se rastoarna de 8-10 ori pentru omogenizarea sangelui cu anticoagulantul.Se pun in stativ in ordine, se inregistreaza ora si se citeste conform prospectului producatorului la 1 h sau la 1/2 h.Rezultatul se inregistreaza in Registrul de analize cod RGL-4.4.-0.3-L, apoi in sistemul informatic unde se valideaza si apoi se imprima in Buletinul de analiza, COD FGL 5.8-01.
.

5.2.7.Controlul intern de calitate.
Repetarea citirii unei probe de catre doua persoane diferite, min. o proba /zi, ca si coraborarea cu alte rezultate indicate de alte investigatii de laborator.

5.2.8.Protectia personalului
Toate masurile trebuie sa reflecte practica corecta in laborator :
-ordine si curatenie ;
-purtarea halatelor de protectie si a manusilor de protectie
–spalarea manilor cu apa si sapun si apoi cu solutie de decontaminare dupa manipularea probelor si inainte de a parasi zona de lucru ;
-decontaminarea suprafetelor dupa terminarea activitatii cat si dupa orice contaminare accidentala ;
-efectuarea controlului medical periodic ;
-asigurarea accesului controlat al persoanelor straine.

5.2.9.Exprimarea si interpretarea rezultatelor
Rezultatele determinarii VSH se exprima in mm/1 ora
Valori normale :barbati<50 ani :<15mm/h
>50 ani :<20mm/h
femei<50 ani :<15mm/h
>50 ani :<30mm/h
copii mici si sugari :9-12mm/h
Valorile VSH sunt influentate de factori eritrocitari(anemia creste VSH)si plasmatici (favorizeaza formarea de rulouri de ex fibrinogen, Ig) .
VSH creste in inflamatii, infectii acute si cronice, hemopatii maligne, neoplasme, infarct miocardic.
VSH scade in poliglobulie, insuficienta cardiaca, deshidratare, infectii virale.

6.RESPONSABILITATI

6.1 Seful de laborator
- stabileste programul de control extern inter laboratoare ;
- verifica si aproba buletinul de analiza ;
- asigura consultanta privind rezultatele cand este solicitat ;
- asigura resursele materiale
- supravegheaza si verifica periodic modul de executie si calitatea rezultatelor.

6.2. Responsabilul Calitatii
- stabileste programul de control intern ;
- verifica si valideaza rezultatele controlului intern ;
- executa analizele pentru care este responsabil**.**

6.3.Responsabilul de analiza
- pregateste proba si stativele ;
- executa proba ;

- inregistreaza rezultatele in Registrul de analiza, Sistemul informatic, valideaza rezultatul, imprima Buletinul de analiza COD FGL 5.8-01.

7. INREGISTRARI

Registrul comenzi interne –cod RGL-4.4-01I/E
Registru de analiza cod-RGL-4.4-03-L
Sistem informatic –SUI
Buletin de analiza-COD FGL-5.8.-01

8. ANEXE

-

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICA

DETERMINAREA GRUPELOR SANGUINE IN SISTEMUL ABO SI Rh(D)

COD: PSL – H4-05

Editia 1, Revizia 0

Din data de

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Responsabil Calitate
As.Lorena Zaborila

Elaborat:
Sef compartiment Hematologie:
Dr Denisa Covaciuc

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment: Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1		Dr. Rodica Fântânaru					
Sef compartiment Hematologie	2		Dr. Denisa Covaciuc					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1. SCOP..... 5

2. DOMENIUL DE APLICARE 5

3. DOCUMENTE DE REFERINTA..... 5

4.DEFINITII SI ABREVIERI 5

4.1.Definitii 5

4.2. Prescurtari..... 6

5.DESCRIEREA PROCEDURII 6

5.1. Metoda Beth-Vincent(eritrocitara) 6

5.2. Metoda Simonin(serica) 7

5.3.Factori de eroare ……9

5.4.Deteriminarea factorului Rh(D)……....9

5.5.Activitati finale……..9

5.6.Controlul intern de calitate…….9

5.7.Protectia personalului si mediului……...9

6.RESPONSABILITATI…….9

7.INREGISTRARI……9

1. SCOP

Scopul acestei proceduri este de a prezenta modul de desfasurare a activitatii de determinare a grupelor sanguine.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplica in cadrul compartimentului de hematologie in vederea determinarii grupelor sanguine in sistemul ABO si Rh (D) prin doua metode:eritrocitara (Beth-Vincent) si serica (Simonin) de catre doua persoane cu doua randuri de reactivi.
Proba de sange (venos sau capilar) recoltata in punctele de recoltare stabilite conform MRL -5.4.1 este preluata la receptie , verificata , numerotata, inregistrata in Registrul de comenzi interne cod RGL 4.4 -0.1-I/E si transmisa in compartimentul 04.Aici este inregistrata in Registrul de analiza cod RGL 4.4.-0.3-L, executata, introdusa in SIU, validata si eliberata ca rezultat final in buletinul de analiza.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

3.1. SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;

3.2. SR-EN/TR 22869:2003 - Ghid pentru implementarea in laboratoare a ISO15189

3.3. MANUALUL CALITATII , Cod: MCL

3.4.Paun R „Tratat de medicina interna-Hematologie.Ed Medicala Bucuresti 1997

3.5.Kondi V. "Laborator clinic –Hematologie „-Ed Medicala 1981

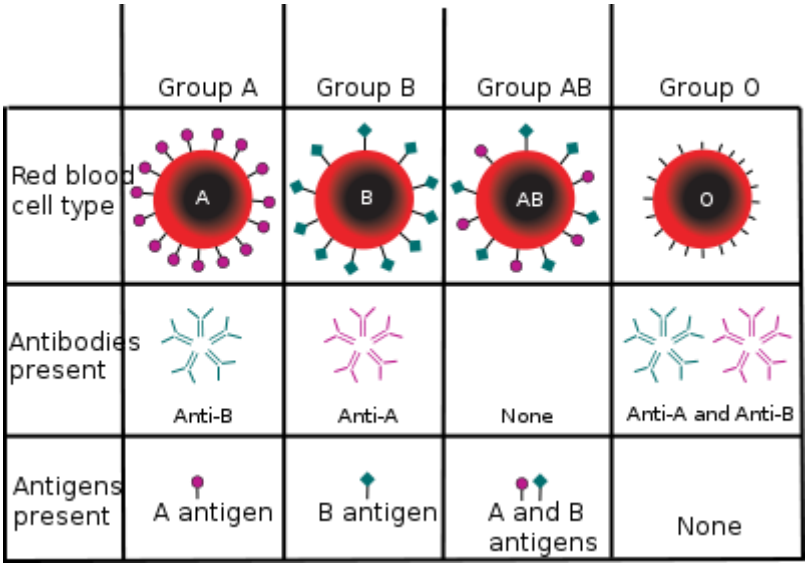
3.6.Prospect trusa reactivi

3.7.Manualul de recoltare PGL 5.4.-1

4.DEFINITII SI ABREVIERI

4.1.Definitii:

Determinarea grupelor sanguine se bazeaza pe fenomenul de aglutinare ce trebuie sa apara intre aglutinogenele(Ag) eritrocitare A, B si aglutininele(Ac) omologi lor, anti-A si anti-B.
O persoana poseda in ser Ac corespunzatori Ag absente pe eritrocite.



4.2. ABREVIERI

Ag-antigen/e
Ac-anticorp/i

5.Descrierea procedurii:

5.1. Metoda Beth –Vincent (eritrocitara):

5.1.1.Principii.
Se pune in contact pe lama ser hemotest care contine Ac cunoscuti cu sange de grup necunoscut .Aparitia hemaglutinarii indica prezenta Ag corespunzator si formarea complexelorAg-Ac.

5.1.2. Materiale necesare:

- seruri hemotest monoclonale(O-anti AB, A-anti-B, B-antiA);
- lame de sticla curate , degresate;
- solutie de decontaminare.

5.1.3. Tehnica de lucru:
Pe lama se pune succesiv de la stanga la dreapta cate o picatura de ser hemotest in ordinea urmatoare:O, A, B.Cu coltul unei lame se adauga in volum 1/10 cate o picatura din sangele de cercetat, schimband coltul acesteia pentru fiecare picatura cu ser hemotest.
Se amesteca pentru o omogenizare completa .
Se imprima lamei o miscare rotativa lenta .
Citirea se face cu ochiul liber in 2'-3' apreciindu-se prezenta sau absenta aglutinarii.

5.1.4.Interpretarea rezultatelor
Daca in toate picaturile nu apare aglutinare amestecurile ramanand roz, uniforme, sangele cercetat e de grupa 0.
Daca apare aglutinare cu serurile O si B si lipsa de aglutinare cu serul A sangele este de grup A.
Daca apare aglutinare cu serurile O si A si lipsa ei cu serul B sangele este de grup B.
Daca aglutinarea este prezenta in toate picaturile sangele este de grup AB.

5.2. Metoda Simonin (serica).
Determina aglutininele in serul de cercetat anti –A si anti-B cu hematii test O, A, B recoltate proaspat, controlate si refrigerate pana la 7 zile.

5.2.1. Materiale necesare:
- hematii test O, A, B.
- lame de sticla;
- solutie de decontaminare

5.2.2. Tehnica
Pe o lama se pun 3 picaturi din serul de cercetat.
Apoi succesiv, de la stanga la dreapta se pun hematiile test O, A, B omogenizandu-se cu coltul lamei diferit de fiecare data.
Raportul eritrocitelor/ser sa fie 1/10.
Citire cu ochiul liber in 2'-3 ' dupa rotirea lenta a lamei support.

5.2.3. Interpretarea rezultatelor
Reactia negativa-absenta aglutinarii.
Sangele cercetat este de grup AB(O).
Reactia pozitiva –prezenta aglutinarii in cele 2 picaturi A, B –sangele este de grup O(αβ.).
Lipsa de aglutinare cu eritrocite A si aglutinare cu eritrocite B=sangele este de grup A(β).
Lipsa aglutinarii cu eritrocite B dar aglutinare cu eritrocite A=sangele este de grup B(α).
Cu eritrocite O pentru toate grupele reactia e negativa.

5.3.Factori de eroare in determinarea grupelor sanguine

5.3.1.Erori datorate sangelui de cercetat

- Autoaglutinarea determinata de prezenta auto-Ac respectiv aglutinine la rece Indiferent de grupe si metode de determinare toate picaturile din reactie vor prezenta aglutinare.Prin incalzire 30 de minute la $37C^0$ fenomenul dispare.
- Hemoliza eritrocitelor datorata prezentei C' seric ce poate inhiba sau reduce aglutinarea .Inactivarea serului 30' la $56C^0$ inlatura fenomenul.
- Aparitia Ac specifici iregulari .Dau erori in metoda Simonin la femei Rh(D) negative izoimunizate prin sarcini repetate cu titruri inalte de Ac anti Rh.Remediul este folosirea eritrocitelor test Rh negativ in reactie.
- Influenta varstei:pana ala 3-5 luni aglutinogenele se exprima slab in reactie
- Transfuziile cu solutii macromoleculare pot induce fenomene de autoaglutinare.Spalarea eritrocitelor inlatura riscul de eroare.

5.3.2.Erori datorate serurilor hemotest:expirate, cu titrul scazut de Ac, infectate

5.3.3.Erori datorate eritrocitelor test:infectate, invechite.

5.3.4.Greseli de tehnica:citire tardiva (pseudoaglutinare), coagularea picaturii de sange, hemoliza , etichetarea gresita a reactivilor.
Daca exista dubii se repeta determinarea cu alt set de reactivi si eritrocite test.

5.4.Determinarea factorului Rh(D)
Materiale necesare:

- ser antiRh(D);
- eritrocite cunoscute Rh+ si Rh- suspensie in ser propriu;
- lame de sticla

Tehnica: pe o lama se depune o picatura de ser hemotest antiRh(D)si o picatura din prelevatul de cercetat;pe o alta lama se repeta aceeasi operatiune cu eritrocite martor, omogenizandu-se cu coltul diferit al unei lame.
Lamele se rotesc lent pentru a urmari aparitia aglutinarii timp de 2-3 minute.
Prezenta aglutinarii in picatura cu sangele de cercetat=Rh(D) pozitiv.
In picaturile de control, eritrocitele Rh(D)+trebuie sa fie aglutinate iar cele Rh(D) negative nu trebuie sa fie aglutinate.
Lipsa aglutinarii in picatura de cercetat-Rh(D) negativ.

5.5.Activitati finale
Lamele se imerseaza in solutie docontaminanta urmand circuitul prestabilit.
Vacutainerele cu sangele de cercetat urmeaza circuitul de colectare, depozitare si transport al deseurilor.

5.6.Controlul intern de calitate
Repetarea citirii rezultatelor de doua persoane diferite, executarea reactiilor cu truse de la doi producatori diferiti si prin cele doua metode (eritrocitara si serica), asigura rezultate de calitate conform standardului in vigoare.

5.7.Protectia personalului si mediului.
Se respecta cu strictete cerintele de biosecuritate pentru protectia personaluluisi a mediului inconjurator.
Toate masurile trebuie sa reflecte practica corecta in laborator:
-ordine si curatenie;
-purtarea halatelor de protectie si a manusilor de protectie
–spalarea manilor cu apa si sapun si apoi cu solutie de decontaminare dupa manipularea probelor si inainte de a parasi zona de lucru;
-decontaminarea suprafetelor dupa terminarea activitatii cat si dupa orice contaminare accidentala;
-efectuarea controlului medical periodic;
-asigurarea accesului controlat al persoanelor straine..

6.RESPONSABILITATI

6.1 Seful de laborator
- stabileste programul de control extern inter laboratoare;
- verifica si aproba buletinul de analiza;
- asigura consultanta privind rezultatele cand este solicitat;
- asigura resursele materiale
- supravegheaza si verifica periodic modul de executie si calitatea rezultatelor.

6.2. Responsabilul Calitatii
- stabileste programul de control intern;
- verifica si valideaza rezultatele controlului intern;
- executa analizele pentru care este responsabil**.**

6.3.Responsabilul de analiza
- pregateste proba si stativele;
- executa proba;
- inregistreaza rezultatele in Registrul de analiza, Sistemul informatic, valideaza rezultatul, imprima Buletinul de analiza.

7. INREGISTRARI

Registrul comenzi interne -codRGL-4.4-01I/E
Registru de analiza cod-RGL-4.4-03-L
Sistem informatic –SUI
Buletin de analiza-FGL 5.8-01

8. ANEXE
-